



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

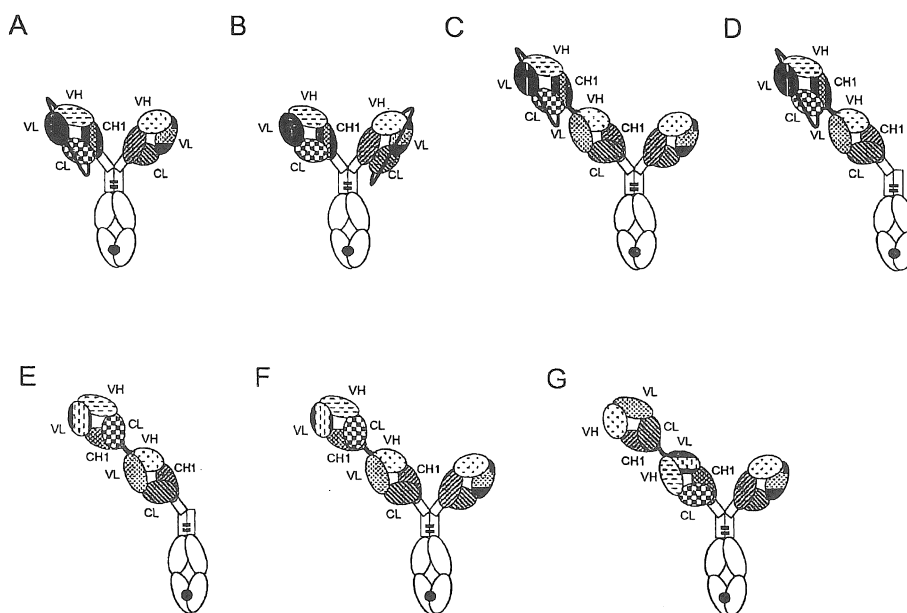
(11) 
1-0022213

(51)⁷ C07K 16/30, A61K 39/395, A61P 35/00, (13) B
C07K 16/28, 16/40, 16/46

-
- | | | | | | |
|------|--|------------|------------|---------------|------------|
| (21) | 1-2014-00547 | (22) | 21.08.2012 | | |
| (86) | PCT/EP2012/066215 | 21.08.2012 | (87) | WO2013/026833 | 28.02.2013 |
| (30) | 11178370.0 | 23.08.2011 | EP | | |
| | 12168192.8 | 16.05.2012 | EP | | |
| (45) | 25.11.2019 | 380 | (43) | 25.09.2014 | 318 |
| (73) | ROCHE GLY CART AG (CH)
Wagistrasse 18, CH-8952 Schlieren, Switzerland | | | | |
| (72) | Oliver Ast (DE), Peter Bruenker (DE), Tanja Fauti (DE), Anne Freimoser-Grundschober (CH), Christiane Jaeger (DE), Christian Klein (DE), Ekkehard Moessner (DE), Pablo Umana (CR) | | | | |
| (74) | Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.) | | | | |
-

(54) PHÂN TỬ GẮN KẾT KHÁNG NGUYÊN ĐẶC HIỆU KÉP HOẠT HÓA TẾ BÀO T VÀ ĐƯỢC PHẨM CHỨA PHÂN TỬ NÀY

(57) Nhìn chung, sáng chế đề cập tới phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép để hoạt hóa tế bào T và sự tái hướng đến các tế bào đích cụ thể. Ngoài ra, sáng chế đề cập tới polynucleotit mã hóa cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép, và vectơ và tế bào chủ chứa polynucleotit này. Sáng chế còn đề cập tới phương pháp sản xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép của sáng chế, và đến phương pháp sử dụng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép này trong điều trị bệnh.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập tới phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép để hoạt hóa tế bào T. Ngoài ra, sáng chế đề cập tới polynucleotit mã hóa cho các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép này, phương pháp sản xuất các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép được bộc lộ ở đây, và được phẩm chứa các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự phá hủy chọn lọc của tế bào riêng lẻ hoặc loại tế bào đặc hiệu thường là mong muốn trong một loạt thiết lập lâm sàng. Ví dụ, nó là mục đích chính của trị liệu ung thư để phát hủy cụ thể các tế bào khối u, trong khi để lại các tế bào và các mô khỏe mạnh nguyên vẹn và không bị phá hủy.

Cách thu hút đạt được mục đích này là bằng cách gây kích ứng đáp ứng miễn dịch kháng khối u, để tạo ra tế bào tác động miễn dịch như các tế bào diệt tự nhiên (NK) hoặc các tế bào lympho gây độc tế bào T (các CTL) tấn công và phá hủy tế bào khối u. Các CTL cấu thành các tế bào tác động hiệu nghiệm nhất của hệ miễn dịch, tuy nhiên chúng không thể được hoạt hóa bằng cơ chế tác động được điều tiết bởi miễn Fc của kháng thể trị liệu thông thường.

Liên quan đến vấn đề này, kháng thể đặc hiệu kép được mô tả gắn kết với một “nhánh” với bề mặt kháng nguyên trên các tế bào đích, và với “nhánh” thứ hai với thành phần hoạt hóa, không biến đổi của phức hợp thể tế bào T, đã trở thành mối quan tâm trong những năm gần đây. Gắn kết đồng thời của sáng chế này với cả hai trong số các đích của nó sẽ ảnh hưởng đến sự tương tác tạm thời giữa tế bào đích và tế bào T, gây hoạt hóa tế bào T độc hại tế bào bất kỳ sau đó phân giải tế bào đích. Do vậy, đáp ứng miễn dịch được tái hướng đến các tế bào đích và độc lập với sự có mặt kháng nguyên peptit bằng tế bào đích hoặc tính đặc hiệu của tế bào T vì sẽ liên quan đến sự hoạt hóa bị giới hạn ở MHC bình thường của các CTL. Trong trường hợp này, có tính quyết định rằng các CTL chỉ được hoạt hóa khi tế bào đích thể hiện kháng thể đặc hiệu kép với chúng, tức là, khớp thân kinh miễn dịch được bắt chước. Mong muốn đặc biệt là kháng thể đặc hiệu kép mà không cần tế bào lympho tiền điều hòa hoặc đồng kích thích để tạo ra sự phân giải đủ của các tế bào đích.

Một số dạng kháng thể đặc hiệu kép đã được phát triển và độ thích hợp của chúng đối với tế bào T được tạo ra bởi trị liệu miễn dịch được nghiên cứu. Ngoài các dạng này, được gọi là các phân tử BiTE (bộ khớp nối tế bào T đặc hiệu kép) đã được biệt hóa rất tốt và đã được thể hiện trong một số đảm bảo trong lâm sàng (được xem xét trong Nagorsen and Bäuerle, *Exp Cell Res* 317, 1255-1260 (2011)). Các BiTE là các phân tử scFv nối tiếp trong đó hai phân tử scFv được dung hợp bằng liên kết mềm dẻo. Các dạng đặc hiệu kép khác được đánh giá đối với sự khớp nối tế bào T gồm các kháng thể thể đôi (Holliger et al., *Prot Eng* 9, 299-305 (1996)) và các dẫn xuất của chúng, như các kháng thể thể đôi nối tiếp (Kipriyanov et al., *J Mol Biol* 293, 41-66 (1999)). Sự phát triển gần đây hơn còn được gọi là các phân tử DART (tái tạo đích ái lực kép), mà dựa trên dạng kháng thể thể đôi nhưng đặc điểm cầu disulfua tận cùng C để ổn định hóa thêm (Moore et al., *Blood* 117, 4542-51 (2011)). Cái được gọi là triomab, mà lai hóa hoàn toàn các phân tử IgG ở chuột nhất/ở chuột và cũng đồng thời được đánh giá trong các thử nghiệm lâm sàng, là dạng có kích cỡ lớn hơn (được xem xét trong Seimetz et al., *Cancer Treat Rev* 36, 458-467 (2010)).

Một loạt các dạng đang được phát triển thể hiện có tiềm năng lớn góp phần vào sự tái hướng tế bào T và sự hoạt hóa trong trị liệu miễn dịch. Nhiệm vụ tạo ra kháng thể đặc hiệu kép thích hợp cho việc đó, tuy nhiên, không có nghĩa không đáng kể, nhưng liên quan đến những thách thức mà cần phải đáp ứng liên quan đến hiệu quả, độ độc tính, khả năng áp dụng và khả năng sản xuất của kháng thể.

Các cấu trúc nhỏ như, ví dụ, các phân tử BiTE – trong khi có khả năng gắn kết chéo một cách hiệu quả chất tác động và các tế bào đích – có chu kỳ bán hủy huyết thanh rất ngắn cần chúng cần được sử dụng cho các bệnh nhân bằng cách truyền liên tục. Các dạng giống như IgG một mặt – trong khi có lợi đáng kể về chu kỳ bán hủy dài – bị độc tính có liên quan đến các chức năng tác động tự nhiên vốn có đối với các phân tử IgG. Khả năng miễn dịch của chúng tạo thành đặc điểm không thích hợp khác nữa kháng thể đặc hiệu kép giống như IgG, đặc biệt là các dạng không phải ở người, cho phát triển trị liệu thành công. Cuối cùng, thách thức chính trong sự phát triển chung của kháng thể đặc hiệu kép đã sản xuất các cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép với số lượng đủ về mặt lâm sàng và độ tinh khiết, do sự ghép đôi sai của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể có nét đặc trưng khác khi đồng biểu hiện, mà làm giảm hiệu suất của cấu trúc được kết cấu chính xác và tạo ra số các sản phẩm phụ không chức năng mà từ đó từ kháng thể đặc hiệu kép mong muốn có thể là khó tách.

Các khó khăn và bất lợi được đưa ra có liên quan đến kháng thể đặc hiệu kép hiện có sẵn đối với trị liệu miễn dịch do tế bào T gây ra, vẫn cần các dạng được cải thiện mới của các

phân tử này. Sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép được thiết kế cho sự hoạt hóa tế bào T và sự tái hướng mà kết hợp hiệu quả tốt và khả năng sản xuất với độ độc tính thấp và các tính chất được động học thích hợp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai, một trong số đó là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T và số còn lại là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, và miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai có khả năng kết hợp ổn định; trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo, trong đó vùng biến đổi hoặc không đổi của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được chuyển đổi, trong đó (i) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất; hoặc (ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai; và trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa không quá một gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T phân tử gắn kết (tức là, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T tạo ra liên kết hóa trị một với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T).

Được bộc lộ ở đây, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được dung hợp với nhau, tùy chọn thông qua liên kết peptit. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất. Theo phương án khác nữa, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai. Theo các phương án này, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên (i) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất hoặc (ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai, ngoài ra chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai có thể được dung hợp với nhau, tùy chọn thông qua liên kết peptit.

Theo một phương án, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc. Theo phương án khác nữa, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc.

Theo các phương án nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba mà là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích. Theo một phương án này, gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc. Theo phương án cụ thể, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba của phân tử gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T được dung hợp ở đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của một trong số các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc, và gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai. Theo phương án cụ thể khác nữa, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ ba của phân tử gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T được dung hợp ở đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của một trong số các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc, và gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất. Thành phần của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được dung hợp trực tiếp hoặc qua các liên kết peptit thích hợp. Theo một phương án, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba của phân tử gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T mỗi gốc được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của một trong các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba và miền Fc là một phần của phân tử globulin miễn dịch. Theo phương án cụ thể, phân tử globulin miễn dịch là globulin miễn dịch lớp IgG.

Theo phương án cụ thể, miền Fc là miền Fc của IgG. Theo phương án cụ thể, miền Fc là miền Fc của IgG₁. Theo phương án cụ thể khác nữa, miền Fc là miền Fc của IgG₄. Theo các phương án cụ thể, miền Fc là miền Fc ở người.

Theo các phương án cụ thể, miền Fc bao gồm việc cải biến thúc đẩy sự liên kết giữa cấu trúc siêu phân tử của miền Fc thứ nhất và thứ hai. Theo phương án cụ thể này, gốc axit amin trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc được thay bằng gốc axit amin có thể tích mạch bên lớn hơn, nhờ đó tạo ra chỗ nhô ra trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất mà có thể định vị trong hốc trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai, và gốc axit amin trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc được thay bằng gốc axit amin có thể tích mạch bên nhỏ hơn, nhờ đó tạo ra hốc trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai trong đó chỗ nhô ra trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất là có thể định vị.

Theo phương án cụ thể, miền Fc thể hiện ái lực gắn kết với thụ thể Fc giảm và/hoặc chức năng tác động giảm, khi so với miền Fc của IgG1 tự nhiên. Theo một phương án, miền Fc chứa một hoặc nhiều phần thể axit amin mà làm giảm việc gắn kết với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động. Theo một phương án, một hoặc nhiều phần thể axit amin trong miền Fc mà làm giảm việc gắn kết với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động ở một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm gồm L234, L235, và P329 (đánh số theo EU). Theo các phương án cụ thể, mỗi cấu trúc siêu phân tử của miền Fc chứa ba phần thể axit amin mà làm giảm việc gắn kết với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động trong đó, phần thể axit amin đã nêu là L234A, L235A và P329G. Theo một phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fcγ. Theo một phương án, chức năng tác động là độ độc hại tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC).

Theo phương án cụ thể, kháng nguyên hoạt hóa tế bào T phân tử gắn kết khả năng gắn kết là CD3. phân tử gắn kết khả năng gắn kết Theo một phương án, kháng nguyên tế bào đích được chọn từ nhóm gồm: Chondroitin sulfat proteoglycan liên quan đến khối u ác tính - (Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan - MCSP), thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR), kháng nguyên ung thư phôi (Carcinoembryonic Antigen-CEA), protein hoạt hóa nguyên bào sợi (Fibroblast Activation Protein - FAP), CD19, CD20 và CD33.

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế, phương pháp này bao gồm các bước a) nuôi cấy tế bào chủ chứa polynucleotit được phân lập của sáng chế, hoặc vectơ chứa polynucleotit được phân lập của sáng chế, trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện phân tử

gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T và b) thu hồi phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T. Sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế và chất mang được dụng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1. Các cấu hình minh họa của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được mô tả ở đây. Minh họa phân tử (A) “1+1 IgG scFab, một nhánh”, và (B) “1+1 IgG scFab, một nhánh đảo ngược”. Trong phân tử “1+1 IgG scFab, một nhánh” chuỗi nhẹ của Fab đích tế bào T được dung hợp với chuỗi nặng bằng liên kết, trong khi phân tử “1+1 IgG scFab, một nhánh đảo ngược” tác nhân liên kết trong Fab tạo đích khối u. (C) Minh họa của phân tử “2+1 IgG scFab”. (D) Minh họa của phân tử “1+1 IgG scFab”. (E) Minh họa của phân tử “1+1 IgG Crossfab”. (F) Minh họa của phân tử “2+1 IgG Crossfab”. (G) Minh họa của phân tử “2+1 IgG Crossfab” với bộ khác của Crossfab và thành phần Fab (“đảo ngược”). (H) Minh họa của phân tử “dung hợp 1+1 IgG Crossfab chuỗi nhẹ (LC)”. (I) Minh họa của phân tử “1+1 CrossMab”. (J) Minh họa của phân tử “2+1 IgG Crossfab, chuỗi nhẹ được liên kết”. (K) Minh họa của phân tử “1+1 IgG Crossfab, chuỗi nhẹ được liên kết”. (L) Minh họa của phân tử “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược, chuỗi nhẹ được liên kết”. (M) Minh họa của phân tử “1+1 IgG Crossfab, đảo ngược, chuỗi nhẹ được liên kết”. Dấu chấm màu đen: sự biến đổi tùy ý trong miền Fc thúc đẩy sự dime hóa khác loại.

FIG.2. SDS PAGE (4-12% Bis/Tris, NuPage Invitrogen, được nhuộm màu Coomassie) của “1+1 IgG scFab, một nhánh” (kháng-MCSP/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 1, 3, 5), không giảm (A) và giảm (B), và của “1+1 IgG scFab, một nhánh đảo ngược” (kháng-MCSP/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 7, 9, 11), không giảm (C) và giảm (D).

FIG.3. Sắc ký loại trừ theo phân tích kích cỡ (Superdex 200 10/300 GL GE Healthcare; 2 mM MOPS, độ pH = 7,3, 150 mM NaCl, 0,02% (khối lượng/thể tích) NaCl; 50 µg mẫu được tiêm) của “1+1 IgG scFab, một nhánh” (kháng-MCSP/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 1, 3, 5) (A) và “1+1 IgG scFab, một nhánh đảo ngược” (kháng-MCSP/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 7, 9, 11) (B).

FIG.4. SDS PAGE (4-12% Bis/Tris, NuPage Invitrogen, được nhuộm màu Coomassie) của “1+1 IgG scFab, một nhánh” (kháng-EGFR/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 43, 45, 57), không giảm (A) và giảm (B), và của “1+1 IgG scFab, một nhánh đảo ngược” (kháng-EGFR/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 11, 49, 51), không giảm (C) và giảm (D).

FIG.5. Sắc ký loại trừ theo phân tích kích cỡ (Superdex 200 10/300 GL GE Healthcare; 2 mM MOPS, độ pH = 7,3, 150 mM NaCl, 0,02% (khối lượng/thể tích) NaCl; 50 µg mẫu được tiêm) của “1+1 IgG scFab, một nhánh” (kháng-EGFR/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 43, 45, 47) (A) và “1+1 IgG scFab, một nhánh đảo ngược” (kháng-EGFR/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 11, 49, 51) (B).

FIG.6. (A, B) SDS PAGE (4-12% Bis/Tris, NuPage Invitrogen, được nhuộm màu Coomassie) của “1+1 IgG scFab, một nhánh đảo ngược” (kháng-FAP/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 11, 51, 55), không giảm (A) và giảm (B). (C) Sắc ký loại trừ theo phân tích kích cỡ (Superdex 200 10/300 GL GE Healthcare; 2 mM MOPS, độ pH = 7,3, 150 mM NaCl, 0,02% (khối lượng/thể tích) NaCl; 50 µg mẫu được tiêm) của “1+1 IgG scFab, một nhánh đảo ngược” (kháng-FAP/kháng-huCD3).

FIG.7. SDS PAGE (4-12% Bis/Tris, NuPage Invitrogen, được nhuộm màu Coomassie) của (A) “2+1 IgG scFab, P329G LALA” (kháng-MCSP/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 5, 21, 23), không giảm (lần 2) và giảm (lần 3); của (B) “2+1 IgG scFab, LALA” (kháng-MCSP/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 5, 17, 19), không giảm (lần 2) và giảm (lần 3); của (C) “2+1 IgG scFab, wt” (kháng-MCSP/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 5, 13, 15), không giảm (lần 2) và giảm (lần 3); và của (D) “2+1 IgG scFab, P329G LALA N297D” (kháng-MCSP/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 5, 25, 27), không giảm (lần 2) và giảm (lần 3).

FIG.8. Sắc ký loại trừ theo phân tích kích cỡ (Superdex 200 10/300 GL GE Healthcare; 2 mM MOPS, độ pH = 7,3, 150 mM NaCl, 0,02% (khối lượng/thể tích) NaCl; 50 µg mẫu được tiêm) của (A) “2+1 IgG scFab, P329G LALA” (kháng-MCSP/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 5, 21, 23); của (B) “2+1 IgG scFab, LALA” (kháng-MCSP/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 5, 17, 19); của (C) “2+1 IgG scFab, wt” (kháng-MCSP/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 5, 13, 15); và of (D) “2+1 IgG scFab, P329G LALA N297D” (kháng-MCSP/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 5, 25, 27).

FIG.9. (A, B) SDS PAGE (4-12% Bis/Tris, NuPage Invitrogen, được nhuộm màu Coomassie) của “2+1 IgG scFab, P329G LALA” (kháng-EGFR/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 45, 47, 53), không giảm (A) và giảm (B). (C) Sắc ký loại trừ theo phân tích kích cỡ (Superdex 200 10/300 GL GE Healthcare; 2 mM MOPS, độ pH = 7,3, 150 mM NaCl, 0,02% (khối lượng/thể tích) NaCl; 50 µg mẫu được tiêm) của “2+1 IgG scFab, P329G LALA” (kháng-EGFR/kháng-huCD3).

FIG.10. (A, B) SDS PAGE (4-12% Bis/Tris, NuPage Invitrogen, được nhuộm màu Coomassie) của “2+1 IgG scFab, P329G LALA” (kháng-FAP/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 57, 59, 61), không giảm (A) và giảm (B). (C) Sắc ký loại trừ theo phân tích kích cỡ (Superdex 200 10/300 GL GE Healthcare; 2 mM MOPS, độ pH = 7,3, 150 mM NaCl, 0,02% (khối lượng/thể tích) NaCl; 50 µg mẫu được tiêm) của “2+1 IgG scFab, P329G LALA” (kháng-FAP/kháng-huCD3).

FIG.11. (A, B) SDS PAGE (4-12% Tris-Acetate (A) hoặc 4-12% Bis/Tris (B), NuPage Invitrogen, được nhuộm màu Coomassie) của “1+1 IgG Crossfab, Fc(lở) P329G LALA / Fc(phần phình) wt” (kháng-MCSP/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 5, 29, 31, 33), không giảm (A) và giảm (B). (C) Sắc ký loại trừ theo phân tích kích cỡ (Superdex 200 10/300 GL GE Healthcare; 2 mM MOPS, độ pH = 7,3, 150 mM NaCl, 0,02% (khối lượng/thể tích) NaCl; 50 µg mẫu được tiêm) của “1+1 IgG Crossfab, Fc(lở) P329G LALA / Fc(phần phình) wt” (kháng-MCSP/kháng-huCD3).

FIG.12. (A, B) SDS PAGE (4-12% Bis/Tris, NuPage Invitrogen, được nhuộm màu Coomassie) của “2+1 IgG Crossfab” (kháng-MCSP/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33), không giảm (A) và giảm (B). (C) Sắc ký loại trừ theo phân tích kích cỡ (Superdex 200 10/300 GL GE Healthcare; 2 mM MOPS, độ pH = 7,3, 150 mM NaCl, 0,02% (khối lượng/thể tích) NaCl; 50 µg mẫu được tiêm) của “2+1 IgG Crossfab” (kháng-MCSP/kháng-huCD3).

FIG.13. (A, B) SDS PAGE (4-12% Bis/Tris, NuPage Invitrogen, được nhuộm màu Coomassie) của “2+1 IgG Crossfab” (kháng-MCSP/kháng-cyCD3) (xem SEQ ID NO 3, 5, 35, 37), không giảm (A) và giảm (B). (C) Sắc ký loại trừ theo phân tích kích cỡ (Superdex 200 10/300 GL GE Healthcare; 2 mM MOPS, độ pH = 7,3, 150 mM NaCl, 0,02% (khối lượng/thể tích) NaCl; 50 µg mẫu được tiêm) của “2+1 IgG Crossfab” (kháng-MCSP/kháng-cyCD3).

FIG.14. (A, B) SDS PAGE (4-12% Bis/Tris, NuPage Invitrogen, được nhuộm màu Coomassie) của “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược” (kháng-CEA/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 33, 63, 65, 67), không giảm (A) và giảm (B). (C) Sắc ký loại trừ theo phân tích kích cỡ (Superdex 200 10/300 GL GE Healthcare; 2 mM MOPS, độ pH = 7,3, 150 mM NaCl, 0,02% (khối lượng/thể tích) NaCl; 50 µg mẫu được tiêm) của “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược” (kháng-CEA/kháng-huCD3).

FIG.15. (A) Độ ổn định nhiệt của “(scFv)₂-Fc” và “(dsScFv)₂-Fc” (kháng-MCSP (LC007)/kháng-huCD3 (V9)). Phân tán ánh sáng động, được đo ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 đến 75°C ở 0,05°C/phút. Đường cong màu đen: “(scFv)₂-Fc”; đường cong màu xám: “(dsScFv)₂-Fc”. (B) Độ ổn định nhiệt của “2+1 IgG scFab” (xem SEQ ID NO 5, 21, 23) và “2+1 IgG Crossfab” (kháng-MCSP/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33). Phân tán ánh sáng động, được đo ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 đến 75°C ở 0,05°C/phút. Đường cong màu đen: “2+1 IgG scFab”; đường cong màu xám: “2+1 IgG Crossfab”.

FIG.16. Thiết lập thử nghiệm Biacore để (A) xác định sự tương tác của các thể đột biến Fc khác nhau với FcγRIIIa ở người, và để (B) gắn kết đồng thời các cấu trúc đặc hiệu kép tế bào T với đích khối u và CD3γ(G₄S)₅CD3γ-AcTev-Fc(phần phình)-Avi/Fc(lỗ) ở người.

FIG.17. Gắn kết đồng thời của các cấu trúc đặc hiệu kép tế bào T với miền D3 của MCSP ở người và CD3γ(G₄S)₅CD3ε-AcTev-Fc(phần phình)-Avi/Fc(lỗ) ở người. (A) “2+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33), (B) “2+1 IgG scFab” (xem SEQ ID NO 5, 21, 23).

FIG.18. Gắn kết đồng thời của các cấu trúc đặc hiệu kép tế bào T với EGFR ở người và CD3γ(G₄S)₅CD3ε-AcTev-Fc(phần phình)-Avi/Fc(lỗ) ở người. (A) “2+1 IgG scFab” (xem SEQ ID NO 45, 47, 53), (B) “1+1 IgG scFab, một nhánh” (xem SEQ ID NO 43, 45, 47), (C) “1+1 IgG scFab, một nhánh đảo ngược” (xem SEQ ID NO 11, 49, 51), và (D) “1+1 IgG scFab” (xem SEQ ID NO 47, 53, 213).

FIG.19. Gắn kết của phân tử “(scFv)₂” (50 nM) với CD3 được biểu hiện trên các tế bào Jurkat (A), hoặc với MCSP trên các tế bào Colo-38 (B) được xác định bằng FACS. Cường độ phát quang trung bình so với tế bào chưa được xử lý và tế bào được nhuộm màu chỉ bằng kháng thể thứ cấp được miêu tả.

FIG.20. Gắn kết của cấu trúc “2+1 IgG scFab, LALA” (xem SEQ ID NO 5, 17, 19) (50 nM) với CD3 được biểu hiện trên các tế bào Jurkat (A), hoặc với MCSP trên tế bào Colo-38 (B) được xác định bằng FACS. Cường độ phát quang trung bình so với tế bào đã được xử lý bằng IgG kháng-CD3 tham khảo (như được chỉ ra), tế bào chưa được xử lý, và tế bào được nhuộm màu chỉ bằng kháng thể thứ cấp được miêu tả.

FIG.21. Gắn kết của “1+1 IgG scFab, một nhánh” (xem SEQ ID NO 1, 3, 5) và các cấu trúc “1+1 IgG scFab, một nhánh đảo ngược” (xem SEQ ID NO 7, 9, 11) (50 nM) với CD3 được biểu hiện trên các tế bào Jurkat (A), hoặc với MCSP trên các tế bào Colo-38 (B)

được xác định bằng FACS. Cường độ phát quang trung bình so với các tế bào đã được xử lý bằng IgG kháng-CD3 hoặc kháng-MCSP (như được chỉ ra), tế bào chưa được xử lý, và tế bào được nhuộm màu chỉ bằng kháng thể thứ cấp được miêu tả.

FIG.22. Gắn kết phụ thuộc vào liều lượng của cấu trúc đặc hiệu kép “2+1 IgG scFab, LALA” (xem SEQ ID NO 5, 17, 19) và IgG kháng-MCSP tương ứng với MCSP trên các tế bào Colo-38 được xác định bằng FACS.

FIG.23. Mức biểu hiện bề mặt của các gen đánh dấu hoạt hóa khác nhau trên các tế bào T ở người sau khi ủ với 1 nM của các cấu trúc đặc hiệu kép “2+1 IgG scFab, LALA” (xem SEQ ID NO 5, 17, 19) hoặc “(scFv)₂” CD3-MCSP với sự có mặt hoặc không có mặt của các tế bào đích khối u Colo-38, như được chỉ ra (tỷ lệ E:T giữa các PBMC với tế bào khối u = 10:1). Được mô tả là mức biểu hiện của gen đánh dấu hoạt hóa sớm CD69 (A), hoặc gen đánh dấu hoạt hóa muộn CD25 (B) trên các tế bào CD8⁺T lần lượt sau 15 hoặc 24 giờ ủ.

FIG.24. Mức biểu hiện bề mặt của gen đánh dấu hoạt hóa muộn CD25 trên các tế bào T ở người sau khi ủ với 1 nM của các cấu trúc đặc hiệu kép “2+1 IgG scFab, LALA” (xem SEQ ID NO 5, 17, 19) hoặc “(scFv)₂” CD3-MCSP với sự có mặt hoặc không có mặt của các tế bào đích khối u Colo-38, như được chỉ ra (tỷ lệ E:T = 5:1). Được mô tả là mức biểu hiện của gen đánh dấu hoạt hóa muộn CD25 trên tế bào T dương tính với CD8 (A) hoặc trên tế bào T dương tính với CD4 (B) sau 5 ngày ủ.

FIG.25. Mức biểu hiện bề mặt của gen đánh dấu hoạt hóa muộn CD25 trên tế bào T dương tính với CD8 ở khi từ hai động vật khác nhau (cyno Nestor, cyno Nobu) sau 43 giờ ủ với các hàm lượng đã chỉ ra của cấu trúc đặc hiệu kép “2+1 IgG Crossfab” (nhắm đích CD3 ở khi và MCSP ở người; xem SEQ ID NO 3, 5, 35, 37), với sự có mặt hoặc không có mặt của các tế bào đích khối u MV-3 biểu hiện MCSP ở người (tỷ lệ E:T = 3:1). Để làm đối chứng, các IgG tham khảo (IgG của CD3 kháng-khi, IgG của MCSP kháng người) hoặc PHA-M kích thích phi sinh lý được sử dụng.

FIG.26. Các mức IFN- γ , được tiết bởi các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người mà được hoạt hóa trong 18,5 giờ bằng cấu trúc đặc hiệu kép “2+1 IgG scFab, LALA” CD3-MCSP (xem SEQ ID NO 5, 17, 19) với sự có mặt của tế bào khối u U87MG (tỷ lệ E:T = 5:1). Để làm đối chứng, các IgG tương ứng kháng-CD3 và kháng-MCSP được sử dụng.

FIG.27. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) tế bào khối u MDA-MB-435 khi đồng nuôi cấy với các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người (tỷ lệ E:T = 5:1) và hoạt hóa trong 20 giờ bằng các lượng khác nhau của các phân tử đặc hiệu kép “2+1 IgG scFab”

(xem SEQ ID NO 5, 21, 23), “2+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33) và “(scFv)₂” và các IgG tương ứng.

FIG.28. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) các tế bào khối u MDA-MB-435 khi đồng nuôi cấy với các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người (tỷ lệ E:T = 5:1), và hoạt hóa trong 20 giờ bằng các lượng khác nhau của các cấu trúc đặc hiệu kép và các IgG tương ứng. Các cấu trúc “2+1 IgG scFab” khác bởi miền Fc của chúng (có miền Fc kiểu đại (xem SEQ ID NO 5, 13, 15), hoặc miền Fc được biến đổi để thủ tiêu (NK) chức năng tế bào tác động: P329G LALA (xem SEQ ID NO 5, 21, 23), P329G LALA N297D (xem SEQ ID NO 5, 25, 27)) và cấu trúc “2+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33) được so sánh.

FIG.29. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) các tế bào khối u Colo-38 khi đồng nuôi cấy với các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người (tỷ lệ E:T = 5:1), được xử lý bằng cấu trúc CD3-MCSP đặc hiệu kép “2+1 IgG scFab, LALA” (xem SEQ ID NO 5, 17, 19), phân tử “(scFv)₂” hoặc các IgG tương ứng trong 18,5 giờ.

FIG.30. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) tế bào khối u Colo-38 khi đồng nuôi cấy với các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người (tỷ lệ E:T = 5:1), đã được xử lý bằng cấu trúc CD3-MCSP đặc hiệu kép “2+1 IgG scFab, LALA” (xem SEQ ID NO 5, 17, 19), phân tử “(scFv)₂” hoặc các IgG tương ứng trong 18 giờ.

FIG.31. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) tế bào khối u MDA-MB-435 khi đồng nuôi cấy với các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người (tỷ lệ E:T = 5:1), và hoạt hóa trong 23,5 giờ bằng các lượng khác nhau của CD3-MCSP đặc hiệu kép “2+1 IgG scFab, cấu trúc LALA” (xem SEQ ID NO 5, 17, 19), phân tử “(scFv)₂” hoặc các IgG tương ứng.

FIG.32. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) tế bào khối u Colo-38 khi đồng nuôi cấy với các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người (tỷ lệ E:T = 5:1) và hoạt hóa trong 19 giờ bằng các lượng khác nhau của các cấu trúc CD3-MCSP đặc hiệu kép “1+1 IgG scFab, một nhánh” (xem SEQ ID NO 1, 3, 5), “1+1 IgG scFab, một nhánh đảo ngược” (xem SEQ ID NO 7, 9, 11) hoặc “(scFv)₂”, hoặc các IgG tương ứng.

FIG.33. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) tế bào khối u Colo-38 khi đồng nuôi cấy với các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người (tỷ lệ E:T = 5:1), đã được xử lý bằng cấu trúc đặc hiệu kép “1+1 IgG scFab” CD3-MCSP (xem SEQ ID NO 5, 21, 213) hoặc phân tử “(scFv)₂” trong 20 giờ.

FIG.34. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) tế bào khối u MDA-MB-435 khi đồng nuôi cấy với các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người (tỷ lệ E:T = 5:1), và hoạt

hóa trong 21 giờ bằng các lượng khác nhau của các cấu trúc đặc hiệu kép và các IgG tương ứng. Các cấu trúc CD3-MCSP đặc hiệu kép “2+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33) và “1+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 5, 29, 31, 33), phân tử “(scFv)₂” và các IgG tương ứng được so sánh.

FIG.35. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) của các tế bào đích khác nhau (các tế bào đích khối u Colo-38 dương tính với MCSP, tế bào gốc trung mô thu được từ tủy xương hoặc mô adipoza, hoặc các tế bào quanh mao mạch từ nhau thai; như được chỉ ra) được gây ra bởi sự kích hoạt của tế bào T ở người bằng 135 ng/ml hoặc 1,35 ng/ml của cấu trúc đặc hiệu kép “2+1 IgG Crossfab” CD3-MCSP (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33) (tỷ lệ E:T = 25:1).

FIG.36. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) của các tế bào đích khối u Colo-38, được đo sau khi ủ qua đêm 21 giờ, khi đồng nuôi cấy với các PBMC ở người và các cấu trúc đặc hiệu kép CD3-MCSP khác nhau (“2+1 IgG scFab, LALA” (xem SEQ ID NO 5, 17, 19) và “(scFv)₂”) hoặc IgG kháng-MCSP được thiết kế di truyền bằng glyco (GlycoMab). Tỷ lệ giữa tế bào tác động và tế bào đích được cố định ở mức 25:1 (A), hoặc được biến đổi như được biểu thị (B). Các PBMC được phân lập từ máu tươi (A) hoặc từ Buffy Coat (B).

FIG.37. Hiệu quả độc tố tế bào phụ thuộc vào thời gian của cấu trúc “2+1 IgG Crossfab”, tạo đích CD3 ở khi và MCSP ở người (xem SEQ ID NO 3, 5, 35, 37). Được mô tả là sự giải phóng LDH từ các tế bào MV-3 biểu hiện MCSP ở người khi đồng nuôi cấy với các PBMC ở khi ban đầu (tỷ lệ E:T = 3:1) trong 24 giờ hoặc 43 giờ. Để làm đối chứng, các IgG tham khảo (IgG của CD3 kháng khi và IgG của MCSP kháng người) được sử dụng ở cùng nồng độ phân tử mol. PHA-M được dùng làm đối chứng cho sự hoạt hóa tế bào T (phi sinh lý).

FIG.38. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) tế bào u melanin MV-3 dương tính với huMCSP khi đồng nuôi cấy với các PBMC ở người (tỷ lệ E:T = 10:1), đã được xử lý bằng các cấu trúc đặc hiệu kép CD3-MCSP khác nhau (“2+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33) và “(scFv)₂”) trong ~26 giờ.

FIG.39. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) tế bào khối u LS-174T dương tính với EGFR khi đồng nuôi cấy với các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người (tỷ lệ E:T = 5:1), đã được xử lý bằng các cấu trúc đặc hiệu kép CD3-EGFR khác nhau (“2+1 IgG

scFab” (xem SEQ ID NO 45, 47, 53), “1+1 IgG scFab” (xem SEQ ID NO 47, 53, 213) và “(scFv)₂”) hoặc các IgG tham khảo trong 18 giờ.

FIG.40. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) tế bào khối u LS-174T dương tính với EGFR khi đồng nuôi cấy với các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người (tỷ lệ E:T = 5:1), đã được xử lý bằng các cấu trúc đặc hiệu kép CD3-EGFR khác nhau (“1+1 IgG scFab, một nhánh” (xem SEQ ID NO 43, 45, 47), “1+1 IgG scFab, một nhánh đảo ngược” (xem SEQ ID NO 11, 49, 51), “1+1 IgG scFab” (xem SEQ ID NO 47, 53, 213) và “(scFv)₂”) hoặc các IgG tham khảo trong 21 giờ.

FIG.41. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) tế bào khối u LS-174T dương tính với EGFR khi đồng nuôi cấy với các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người (A) hoặc tế bào T (B) tự nhiên ở người, đã được xử lý bằng các cấu trúc đặc hiệu kép CD3-EGFR khác nhau (“1+1 IgG scFab, một nhánh” (xem SEQ ID NO 43, 45, 47), “1+1 IgG scFab, một nhánh đảo ngược” (xem SEQ ID NO 11, 49, 51) và “(scFv)₂”) hoặc các IgG tham khảo trong 16 giờ. Tỷ lệ giữa các tế bào tác động và tế bào đích là 5:1.

FIG.42. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) của các nguyên bào sợi GM05389 dương tính với FAP khi đồng nuôi cấy với các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người (tỷ lệ E:T = 5:1), đã được xử lý bằng các cấu trúc đặc hiệu kép CD3-FAP khác nhau (“1+1 IgG scFab, một nhánh đảo ngược” (xem SEQ ID NO 11, 51, 55), “1+1 IgG scFab” (xem SEQ ID NO 57, 61, 213), “2+1 IgG scFab” (xem SEQ ID NO 57, 59, 61) và “(scFv)₂”) trong ~18 giờ.

FIG.43. Phân tích bào kế chảy của các mức biểu hiện của CD107a/b, cũng như các mức perforin trong tế bào T dương tính với CD8 mà đã được xử lý bằng các cấu trúc đặc hiệu kép CD3-MCSP khác nhau (“2+1 IgG scFab, LALA” (xem SEQ ID NO 5, 17, 19) và “(scFv)₂”) hoặc các IgG đối chứng tương ứng với sự có mặt của (A) hoặc không có mặt (B) của các tế bào đích trong 6 giờ. Các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người được ủ với 9,43 nM của các phân tử khác nhau với sự có mặt hoặc không có mặt của các tế bào đích khối u Colo-38 ở tỷ lệ giữa các tế bào tác động với tế bào đích là 5:1. Bổ sung monensin sau giờ ủ đầu tiên để làm tăng các mức protein nội bào bằng cách ngăn ngừa vận chuyển protein. Các cổng được thiết lập trên tất cả các tế bào dương tính với CD107a/b, tế bào dương tính với perforin hoặc các tế bào dương tính kép, như được biểu thị.

FIG.44. Sự tăng sinh tương đối của các tế bào T ở người dương tính với CD8 (A) hoặc dương tính với CD4 (B) khi ủ với 1 nM của các cấu trúc đặc hiệu kép CD3-MCSP khác

nhau (“2+1 IgG scFab, LALA” (xem SEQ ID NO 5, 17, 19) hoặc “(scFv)₂”) hoặc các IgG đối chứng tương ứng với sự có mặt hoặc không có mặt của các tế bào đích khối u Colo-38 ở mức tỷ lệ giữa tế bào tác động và tế bào đích là 5:1. Các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người được gắn nhãn CFSE được đặc trưng bởi FACS. Mức tăng sinh tương đối được xác định bằng cách thiết lập cổng xung quanh các tế bào không tăng sinh và sử dụng số tế bào của cổng này đối với toàn bộ số tế bào được xác định làm tham chiếu.

FIG.45. Các mức xytokin khác nhau được xác định trong dịch nổi của các PBMC ở người sau khi xử lý bằng 1 nM của các cấu trúc đặc hiệu kép CD3-MCSP khác nhau (“2+1 IgG scFab, LALA” (xem SEQ ID NO 5, 17, 19) hoặc “(scFv)₂”) hoặc các IgG đối chứng tương ứng với sự có mặt của (A) hoặc không có mặt (B) của tế bào khối u Colo-38 trong 24 giờ. Tỷ lệ giữa tế bào tác động và tế bào đích là 10:1.

FIG.46. Các mức xytokin khác nhau được xác định trong dịch nổi của máu toàn phần sau khi xử lý bằng 1 nM của các cấu trúc đặc hiệu kép CD3-MCSP khác nhau (“2+1 IgG scFab”, “2+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33) hoặc “(scFv)₂”) hoặc các IgG đối chứng tương ứng với sự có mặt của (A, B) hoặc không có mặt (C, D) của tế bào khối u Colo-38 trong 24 giờ. Trong số các cấu trúc đặc hiệu kép là các cấu trúc “2+1 IgG scFab” khác nhau có miền Fc kiểu đại (xem SEQ ID NO 5, 13, 15), hoặc miền Fc được biến đổi để hủy bỏ (NK) chức năng tế bào tác động (LALA (xem SEQ ID NO 5, 17, 19), P329G LALA (xem SEQ ID NO 5, 2, 23) và P329G LALA N297D (xem SEQ ID NO 5, 25, 27)).

FIG.47. Phân tích CE-SDS. Biểu đồ điện di được thể hiện dưới dạng SDS PAGE của 2+1 IgG Crossfab, chuỗi nhẹ được liên kết (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 179). (làn 1: giảm, làn 2: không giảm).

FIG.48. Sắc ký loại trừ theo phân tích kích cỡ của 2+1 IgG Crossfab, chuỗi nhẹ được liên kết (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 179) (sản phẩm sau cùng). 20 µg mẫu được tiêm.

FIG.49. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) tế bào khối u MV-3 dương tính với MCSP khi đồng nuôi cấy bằng các PBMC ở người (tỷ lệ E:T = 10:1), đã được xử lý bằng các cấu trúc đặc hiệu kép CD3-MCSP khác nhau trong ~ 44 giờ (“2+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33) và “2+1 IgG Crossfab, LC được liên kết” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 179)). Các PBMC ở người được phân tách từ máu tươi của những người tình nguyện khỏe mạnh.

FIG.50. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) tế bào khối u Colo-38 dương tính với MCSP khi đồng nuôi cấy bằng các PBMC ở người (tỷ lệ E:T = 10:1), đã

được xử lý bằng các cấu trúc đặc hiệu kép CD3-MCSP khác nhau trong ~22 giờ (“2+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33) và “2+1 IgG Crossfab, LC được liên kết” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 179)). Các PBMC ở người được phân lập từ máu tươi của những người tình nguyện khỏe mạnh.

FIG.51. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) tế bào khối u Colo-38 dương tính với MCSP khi đồng nuôi cấy bằng các PBMC ở người (tỷ lệ E:T = 10:1), đã được xử lý bằng các cấu trúc đặc hiệu kép CD3-MCSP khác nhau trong ~22 giờ (“2+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33) và “2+1 IgG Crossfab, LC được liên kết” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 179)). Các PBMC ở người được phân lập từ máu tươi của những người tình nguyện khỏe mạnh.

FIG.52. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) tế bào WM266-4 dương tính với MCSP khi đồng nuôi cấy bằng các PBMC ở người (tỷ lệ E:T = 10:1), đã được xử lý bằng các cấu trúc đặc hiệu kép CD3-MCSP khác nhau trong ~22 giờ (“2+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33) và “2+1 IgG Crossfab, LC được liên kết” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 179)). Các PBMC ở người được phân lập từ máu tươi của những người tình nguyện khỏe mạnh.

FIG.53. Mức biểu hiện bề mặt của gen đánh dấu hoạt hóa sớm CD69 (A) và gen đánh dấu hoạt hóa muộn CD25 (B) trên tế bào T dương tính với CD8 ở người sau 22 giờ ủ với 10 nM, 80 pM hoặc 3 pM của các cấu trúc đặc hiệu kép CD3-MCSP khác nhau (“2+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33) và “2+1 IgG Crossfab, LC được liên kết” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 179)) với sự có mặt hoặc không có mặt của các tế bào đích khối u Colo-38 biểu hiện MCSP ở người (tỷ lệ E:T = 10:1).

FIG.54. Phân tích CE-SDS. (A) Biểu đồ điện di được thể hiện dưới dạng SDS-PAGE của 1+1 IgG Crossfab; chuyển đổi VL/VH (LC007/V9) (xem SEQ ID NO 5, 29, 33, 181): a) không giảm, b) giảm. (B) Biểu đồ điện di được thể hiện dưới dạng SDS-PAGE của 1+1 CrossMab; chuyển đổi CL/CH1 (LC007/V9) (xem SEQ ID NO 5, 23, 183, 185): a) giảm, b) không giảm. (C) Biểu đồ điện di được thể hiện dưới dạng SDS-PAGE của 2+1 IgG Crossfab, đảo ngược; chuyển đổi CL/CH1 (LC007/V9) (xem SEQ ID NO 5, 23, 183, 187): a) giảm, b) không giảm. (D) Biểu đồ điện di được thể hiện dưới dạng SDS-PAGE của 2+1 IgG Crossfab; chuyển đổi VL/VH (M4-3 ML2/V9) (xem SEQ ID NO 33, 189, 191, 193): a) giảm, b) không giảm. (E) Biểu đồ điện di được thể hiện dưới dạng SDS-PAGE của 2+1 IgG Crossfab; chuyển đổi CL/CH1 (M4-3 ML2/V9) (xem SEQ ID NO 183, 189, 193, 195): a) giảm, b) không giảm. (F) Biểu đồ điện di được thể hiện dưới dạng SDS-PAGE của 2+1 IgG Crossfab,

đảo ngược; chuyển đổi CL/CH1 (CH1A1A/V9) (xem SEQ ID NO 65, 67, 183, 197): a) giảm, b) không giảm. (G) Biểu đồ điện di được thể hiện dưới dạng SDS-PAGE của 2+1 IgG Crossfab; chuyển đổi CL/CH1 (M4-3 ML2/H2C) (xem SEQ ID NO 189, 193, 199, 201): a) giảm, b) không giảm. (H) Biểu đồ điện di được thể hiện dưới dạng SDS-PAGE của 2+1 IgG Crossfab, đảo ngược; chuyển đổi CL/CH1 (431/26/V9) (xem SEQ ID NO 183, 203, 205, 207): a) giảm, b) không giảm. (I) Biểu đồ điện di được thể hiện dưới dạng SDS-PAGE của “dung hợp chuỗi nhẹ 2+1 IgG Crossfab” (CH1A1A/V9) (xem SEQ ID NO 183, 209, 211, 213): a) giảm, b) không giảm. (J) SDS PAGE (4-12% Bis/Tris, NuPage Invitrogen, được nhuộm màu Coomassie) của “2+1 IgG Crossfab” (kháng-MCSP/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 5, 23, 215, 217), không giảm (trái) và giảm (phải). (K) Biểu đồ điện di được thể hiện dưới dạng SDS-PAGE của “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược” (kháng-MCSP/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 5, 23, 215, 219): a) giảm, b) không giảm. (L) SDS PAGE (4-12% Bis/Tris, NuPage Invitrogen, được nhuộm màu Coomassie) của “1+1 IgG Crossfab” (kháng-CD33/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 33, 213, 221, 223), giảm (trái) và không giảm (phải). (M) SDS PAGE (4-12% Bis/Tris, NuPage Invitrogen, được nhuộm màu Coomassie) của “2+1 IgG Crossfab” (kháng-CD33/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 33, 221, 223, 225), giảm (trái) và không giảm (phải). (N) SDS PAGE (4-12% Bis/Tris, NuPage Invitrogen, được nhuộm màu Coomassie) của “2+1 IgG Crossfab” (kháng-CD20/kháng-huCD3) (xem SEQ ID NO 33, 227, 229, 231), không giảm.

FIG.55. Gắn kết của các cấu trúc đặc hiệu kép (CEA/CD3 “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược (VL/VH)” (xem SEQ ID NO 33, 63, 65, 67) và “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược (CL/CH1) 2 (xem SEQ ID NO 65, 67, 183, 197)) đối với CD3 ở người, được biểu hiện bằng các tế bào Jurkat (A), hoặc với CEA ở người, được biểu hiện bằng các tế bào LS-174T (B) như được xác định bằng FACS. Để làm đối chứng, hàm lượng tối đa tương đương của các IgG tham khảo và nhuộm màu nền do kháng thể thứ hai được gắn nhãn (mảnh AffiniPure F(ab')₂ được liên hợp với FITC ở dê kháng người, mảnh đặc hiệu Fcγ, Jackson Immuno Research Lab # 109-096-098) được đánh giá như vậy.

FIG.56. Gắn kết của các cấu trúc đặc hiệu kép (MCSP/CD3 “2+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33) và “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược” (xem SEQ ID NO 5, 23, 183, 187)) với CD3 ở người, được biểu hiện bằng các tế bào Jurkat (A), hoặc với MCSP ở người, được biểu hiện bằng tế bào khối u WM266-4 (B) như được xác định bằng FACS.

FIG.57. Gắn kết của “dung hợp chuỗi nhẹ 1+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 183, 209, 211, 213) với CD3 ở người, được biểu hiện bằng các tế bào Jurkat (A), hoặc với CEA ở người, được biểu hiện bằng các tế bào LS-174T (B) như được xác định bằng FACS.

FIG.58. Gắn kết của các cấu trúc “2+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 5, 23, 215, 217) và “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược” (xem SEQ ID NO 5, 23, 215, 219) đối với CD3 ở người, được biểu hiện bằng các tế bào Jurkat (A), hoặc MCSP ở người, được biểu hiện bằng tế bào khối u WM266-4 (B) như được xác định bằng FACS.

FIG.59. Mức biểu hiện bề mặt của gen đánh dấu hoạt hóa sớm CD69 (A) hoặc gen đánh dấu hoạt hóa muộn CD25 (B) trên tế bào T dương tính với CD4 hoặc tế bào T dương tính với CD8 ở người sau 24 giờ ủ với các hàm lượng đã chỉ của các cấu trúc CD3/MCSP “1+1 CrossMab” (xem SEQ ID NO 5, 23, 183, 185), “1+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 5, 29, 33, 181) và “2+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33). Thử nghiệm được tiến hành với sự có mặt hoặc không có mặt của các tế bào đích MV-3, như được chỉ ra.

FIG.60. Mức biểu hiện bề mặt của gen đánh dấu hoạt hóa sớm CD25 trên tế bào T dương tính với CD4 hoặc tế bào T dương tính với CD8 từ hai con khi khác nhau (A và B) với sự có mặt hoặc không có mặt của tế bào khối u MV-3 dương tính với huMCSP khi đồng nuôi cấy với các PBMC ở khi (tỷ lệ E:T = 3:1, được bình thường hóa đến các số CD3⁺), đã được xử lý bằng “2+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 5, 23, 215, 217) và “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược” (xem SEQ ID NO 5, 23, 215, 219) trong ~41 giờ.

FIG.61. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) của tế bào khối u MKN-45 (A) hoặc LS-174T (B) khi đồng nuôi cấy với các PBMC ở người (tỷ lệ E:T = 10:1) và hoạt hóa trong 28 giờ bằng các lượng khác nhau của “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược (VL/VH)” (xem SEQ ID NO 33, 63, 65, 67) so với cấu trúc “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược (CL/CH1)” (xem SEQ ID NO 65, 67, 183, 197).

FIG.62. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) tế bào khối u WM266-4 khi đồng nuôi cấy với các PBMC ở người (tỷ lệ E:T = 10:1) và hoạt hóa trong 26 giờ bằng các lượng khác nhau của “2+1 IgG Crossfab (VL/VH)” (xem SEQ ID NO 33, 189, 191, 193) so với cấu trúc “2+1 IgG Crossfab (CL/CH1)” (xem SEQ ID NO 183, 189, 193, 195).

FIG.63. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) tế bào khối u MV-3 khi đồng nuôi cấy với các PBMC ở người (tỷ lệ E:T = 10:1) và hoạt hóa trong 27 giờ bằng các lượng khác nhau của các cấu trúc “2+1 IgG Crossfab (VH/VL)” (xem SEQ ID NO 33, 189, 191, 193) so với “2+1 IgG Crossfab (CL/CH1)” (xem SEQ ID NO 183, 189, 193, 195).

FIG.64. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) của các tế bào khối u WM266-4 (A) hoặc MV-3 (B) dương tính với MCSP ở người khi đồng nuôi cấy với các PBMC ở người (tỷ lệ E:T = 10:1) và hoạt hóa trong 21 giờ bằng các lượng khác nhau của “2+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33), “1+1 CrossMab” (xem SEQ ID NO 5, 23, 183, 185), và “1+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 5, 29, 33, 181), như được chỉ ra.

FIG.65. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) tế bào khối u MKN-45 (A) hoặc LS-174T (B) khi đồng nuôi cấy với các PBMC ở người (tỷ lệ E:T = 10:1) và hoạt hóa trong 28 giờ bằng các lượng khác nhau của “dung hợp 1+1 IgG Crossfab LC” (xem SEQ ID NO 183, 209, 211, 213).

FIG.66. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) tế bào khối u MC38-huCEA khi đồng nuôi cấy với các PBMC ở người (tỷ lệ E:T = 10:1) và hoạt hóa trong 24 giờ bằng các lượng khác nhau của “dung hợp 1+1 IgG Crossfab LC” (xem SEQ ID NO 183, 209, 211, 213) so với tham khảo “2+1 IgG Crossfab” không được tạo đích.

FIG.67. Tiêu diệt (được xác định bằng sự giải phóng LDH) tế bào khối u MV-3 (A) hoặc WM266-4 (B) dương tính với MCSP ở người khi đồng nuôi cấy với các PBMC ở người (tỷ lệ E:T = 10:1), đã được xử lý bằng các cấu trúc “2+1 IgG Crossfab (V9)” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33) và “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược (V9)” (xem SEQ ID NO 5, 23, 183, 187), “2+1 IgG Crossfab (kháng-CD3)” (xem SEQ ID NO 5, 23, 215, 217) và “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược (kháng-CD3)” (xem SEQ ID NO 5, 23, 215, 219).

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Các thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả thông thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật, trừ khi được xác định theo cách khác như sau.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "phân tử gắn kết kháng nguyên" theo nghĩa rộng nhất chỉ phân tử mà gắn kết đặc hiệu chất xác định kháng nguyên. Ví dụ về các phân tử gắn kết kháng nguyên là các globulin miễn dịch và các dẫn xuất, ví dụ các mảnh, của chúng.

Thuật ngữ “đặc hiệu kép” chỉ phân tử gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với ít nhất hai chất xác định kháng nguyên khác biệt. Thông thường, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép chứa hai vị trí gắn kết kháng nguyên, mỗi vị trí trong số đó là đặc hiệu đối với chất xác định kháng nguyên khác nhau. Theo các phương án nhất định, phân tử

gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép có khả năng gắn kết đồng thời hai chất xác định kháng nguyên, cụ thể là hai chất xác định kháng nguyên được biểu hiện trên hai tế bào khác biệt.

Thuật ngữ “hóa trị” trong bản mô tả này biểu thị sự có mặt của số lượng cụ thể của vị trí gắn kết kháng nguyên trong phân tử gắn kết kháng nguyên. Như vậy, thuật ngữ “liên kết hóa trị một với kháng nguyên” biểu thị sự có mặt của một (và không quá một) vị trí gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đối với kháng nguyên trong phân tử gắn kết kháng nguyên.

“Vị trí gắn kết kháng nguyên” chỉ vị trí, tức là, một hoặc nhiều gốc axit amin, của phân tử gắn kết kháng nguyên mà tạo ra sự tương tác với kháng nguyên. Ví dụ, vị trí gắn kết kháng nguyên của kháng thể chứa gốc axit amin từ các vùng xác định bổ thể (các CDR). Phân tử globulin miễn dịch tự nhiên thường có hai vị trí gắn kết kháng nguyên, phân tử Fab thường có một vị trí gắn kết kháng nguyên.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “gốc gắn kết kháng nguyên” chỉ phân tử polypeptit mà gắn kết đặc hiệu với chất xác định kháng nguyên. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng đề hướng thực thể mà nó được gắn (ví dụ gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai) vào vị trí đích, ví dụ vào loại đặc hiệu của tế bào khối u hoặc mô đệm khối u mang chất xác định kháng nguyên. Theo phương án khác nữa, gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng đề hoạt hóa tín hiệu thông qua kháng nguyên đích của nó, ví dụ kháng nguyên phức thụ thể tế bào T. Gốc gắn kết kháng nguyên bao gồm kháng thể và các mảnh của chúng như được xác định thêm trong bản mô tả. Gốc gắn kết kháng nguyên cụ thể gồm miền gắn kết kháng nguyên của kháng thể, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo các phương án nhất định, gốc gắn kết kháng nguyên có thể bao gồm các vùng không đổi của kháng thể như được xác định thêm trong bản mô tả và đã biết trong lĩnh vực. Các vùng không đổi chuỗi nặng hữu ích bao gồm bất kỳ trong số năm isotyp: α , δ , ϵ , γ , hoặc μ . Các vùng không đổi chuỗi nhẹ hữu ích bao gồm bất kỳ trong số hai isotyp: κ và λ .

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất xác định kháng nguyên” là đồng nghĩa với “kháng nguyên” và “epitop,” và chỉ vị trí (ví dụ dài liền kề nhau của các axit amin hoặc cấu trúc cấu hình được tạo thành từ các vùng khác nhau của các axit amin không liền kề) trên đại phân tử polypeptit mà gốc gắn kết kháng nguyên gắn kết vào đó, hình thành phức gốc gắn kết kháng nguyên-kháng nguyên. Chất xác định kháng nguyên hữu ích có thể được tìm thấy, ví dụ, trên bề mặt của tế bào khối u, trên bề mặt của tế bào bị nhiễm khuẩn virus, trên bề mặt của các tế bào bị bệnh khác, trên bề mặt của các tế bào miễn dịch, tự do trong huyết thanh,

và/hoặc trong chất đệm ngoại bào (ECM). Các protein được gọi là các kháng nguyên trong bản mô tả (ví dụ MCSP, FAP, CEA, EGFR, CD33, CD3) có thể là dạng tự nhiên bất kỳ, các protein từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm động vật có vú như các loài linh trưởng (ví dụ người) và các loài gặm nhấm (ví dụ chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Theo phương án cụ thể, kháng nguyên là protein ở người. Khi viện dẫn được thực hiện cho protein đặc hiệu trong bản mô tả, thuật ngữ này bao gồm “chiều dài đầy đủ”, protein chưa được xử lý cũng như dạng protein bất kỳ mà tạo ra từ việc xử lý trong tế bào. Thuật ngữ này còn bao gồm các biến thể của protein có trong tự nhiên, ví dụ các biến thể nối hoặc các biến thể alen. Các protein minh họa ở người có thể dùng làm các kháng nguyên gồm, nhưng không giới hạn ở: Chondroitin Sulfat Proteoglycan liên quan đến khối u ác tính - Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan (MCSP), cũng được biết là Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4 (UniProt no. Q6UVK1 (version 70), NCBI RefSeq no. NP_001888,2); Protein hoạt hóa nguyên bào sợi - (Fibroblast Activation Protein - FAP), cũng được biết là Seprase (Uni Prot nos. Q12884, Q86Z29, Q99998, NCBI Accession no. NP_004451); kháng nguyên Carcinoembryonic (CEA), cũng được biết là phân tử bám dính tế bào liên quan đến kháng nguyên ung thư phôi 5 (UniProt no. P06731 (version 119), NCBI RefSeq no. NP_004354,2); CD33, cũng được biết là gp67 hoặc Siglec-3 (UniProt no. P20138, NCBI Accession nos. NP_001076087, NP_001171079); Thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR), cũng được biết là ErbB-1 hoặc Her1 (UniProt no. P0053, NCBI Accession nos. NP_958439, NP_958440), và CD3, cụ thể là cấu trúc siêu phân tử epsilon của CD3 (xem UniProt no. P07766 (version 130), NCBI RefSeq no. NP_000724.1, SEQ ID NO: 265 đối với trình tự ở người; hoặc UniProt no. Q95LI5 (version 49), NCBI GenBank no. BAB71849.1, SEQ ID NO: 266 đối với trình tự [*Macaca fascicularis*] ở khỉ). Theo các phương án nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây gắn kết với epitop của kháng nguyên hoạt hóa tế bào T hoặc kháng nguyên tế bào đích mà được bảo toàn trong kháng nguyên hoạt hóa tế bào T hoặc kháng nguyên đích từ các loài khác nhau.

Thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu" nghĩa là việc gắn kết được chọn lọc cho kháng nguyên và có thể được phân biệt từ sự tương tác không mong muốn hoặc không đặc hiệu. Khả năng của gốc gắn kết kháng nguyên để gắn kết với chất xác định kháng nguyên đặc hiệu có thể được xác định hoặc thông qua thử nghiệm hấp phụ miễn dịch được liên kết enzym (ELISA) hoặc các kỹ thuật khác quen thuộc với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) (được phân tích trên dụng cụ BIAcore)

(Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)), và thử nghiệm liên kết truyền thống (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). Theo một phương án, mức độ gắn kết của gốc gắn kết kháng nguyên với protein không liên quan là nhỏ hơn khoảng 10% liên kết của gốc gắn kết kháng nguyên với kháng nguyên như được xác định, ví dụ, bằng SPR. Theo các phương án nhất định, gốc gắn kết kháng nguyên mà gắn kết với kháng nguyên, hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên bao gồm gốc gắn kết kháng nguyên, có hằng số phân ly (K_D) bằng $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$, hoặc $\leq 0,001 \text{ nM}$ (ví dụ 10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, ví dụ từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M , ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M).

“Ái lực” dùng để chỉ độ bền của tổng số tương tác không phải cùng hóa trị giữa vị trí liên kết đơn của phân tử (ví dụ, thụ thể) và cặp gắn kết của nó (ví dụ, phối tử). Trừ khi có quy định khác, trong bản mô tả này, “ái lực liên kết” chỉ ái lực liên kết bên trong mà phản ánh sự tương tác 1:1 giữa các thành viên của cặp liên kết (ví dụ, gốc gắn kết kháng nguyên và kháng nguyên, hoặc thụ thể và phối tử của nó). Ái lực của phân tử X đối với cặp Y của nó thông thường có thể được thể hiện bằng hằng số phân ly (K_D), mà là tỷ lệ giữa hằng số phân ly và tốc độ liên kết (lần lượt là k_{off} và k_{on}). Như vậy, các ái lực tương đương có thể bao gồm các hằng số tốc độ khác nhau, chừng nào tỷ lệ hằng số tốc độ giữ nguyên như nhau. Ái lực có thể được xác định bằng các phương pháp đã được tạo ra hợp lý đã biết trong lĩnh vực, bao gồm các phương pháp được mô tả trong bản mô tả. Phương pháp cụ thể để đo ái lực là phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR).

“Liên kết giảm”, ví dụ gắn kết với thụ thể Fc giảm, chỉ giảm về ái lực đối với sự tương tác tương ứng, như được xác định ví dụ bằng SPR. Để làm rõ, thuật ngữ này bao gồm cả sự giảm ái lực đến bằng không (hoặc dưới giới hạn phát hiện của phương pháp phân tích), tức là, loại bỏ hoàn toàn sự tương tác. Trái lại, “liên kết tăng” chỉ sự tăng ái lực liên kết đối với sự tương tác tương ứng.

“Kháng nguyên hoạt hóa tế bào T” trong bản mô tả này chỉ chất xác định kháng nguyên được biểu hiện trên bề mặt của tế bào lympho T, cụ thể là tế bào lympho T gây độc tế bào, mà có khả năng tạo ra sự hoạt hóa tế bào T khi tương tác với phân tử gắn kết kháng nguyên. Cụ thể là, sự tương tác của phân tử gắn kết kháng nguyên với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T có thể gây ra sự hoạt hóa tế bào T bằng cách khởi động thác tín hiệu của phức chất thụ thể tế bào T. Theo phương án cụ thể, kháng nguyên hoạt hóa tế bào T là CD3.

“Hoạt hóa tế bào T” trong bản mô tả này chỉ một hoặc nhiều đáp ứng tế bào của tế bào lympho T, cụ thể là tế bào lympho T gây độc tế bào, được chọn từ: sự tăng sinh, sự biệt hóa, sự tiết cytokin, giải phóng phân tử tác động độc tố tế bào, hoạt tính độc tố tế bào, và sự

biểu hiện của gen đánh dấu hoạt hóa. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây có khả năng kích thích sự hoạt hóa tế bào T. Các thử nghiệm thích hợp để đo sự hoạt hóa tế bào T đã được biết trong lĩnh vực được mô tả trong bản mô tả.

“Kháng nguyên tế bào đích” trong bản mô tả này chỉ chất xác định kháng nguyên có mặt trên bề mặt của tế bào đích, ví dụ tế bào trong khối u như tế bào ung thư hoặc tế bào của mô đệm khối u.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “thứ nhất” và “thứ hai” liên quan đến các gốc gắn kết kháng nguyên v.v. được sử dụng để thuận tiện cho việc phân biệt khi có trên một trong số mỗi loại của gốc. Việc sử dụng các thuật ngữ này không dự định theo trật tự hoặc hướng cụ thể của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T trừ khi có quy định khác.

“Phân tử Fab” chỉ protein gồm miền VH và CH1 của chuỗi nặng (“chuỗi nặng Fab”) và miền VL và CL của chuỗi nhẹ (“chuỗi nhẹ Fab”) của globulin miễn dịch.

Thuật ngữ “được dung hợp” nghĩa là thành phần (ví dụ phân tử Fab và cấu trúc siêu phân tử của miền Fc) được liên kết bằng các liên kết peptit, hoặc là trực tiếp hoặc thông qua một hoặc nhiều liên kết peptit.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “chuỗi đơn” chỉ phân tử chứa monome của axit amin được liên kết thẳng bằng các liên kết peptit. Theo các phương án nhất định, một trong số gốc gắn kết kháng nguyên là phân tử Fab chuỗi đơn, tức là, phân tử Fab trong đó chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được nối bằng liên kết peptit để tạo thành chuỗi peptit đơn. Theo phương án cụ thể này, đầu tận C của chuỗi nhẹ Fab được nối với đầu tận N của chuỗi nặng Fab trong phân tử Fab chuỗi đơn.

Thuật ngữ phân tử Fab “lai chéo” (còn được gọi là “Crossfab”) chỉ phân tử Fab trong đó hoặc vùng biến đổi hoặc các vùng không đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab được chuyển đổi, tức là, phân tử Fab lai chéo chứa chuỗi peptit gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng không đổi chuỗi nặng, và chuỗi peptit gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng không đổi chuỗi nhẹ. Để làm rõ, trong phân tử Fab lai chéo trong đó các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được chuyển đổi, chuỗi peptit chứa vùng không đổi chuỗi nặng trong bản mô tả này được gọi là “chuỗi nặng” của phân tử Fab lai chéo. Trái lại, trong phân tử Fab lai chéo trong đó các vùng không đổi của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được chuyển đổi, chuỗi peptit chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trong bản mô tả này được gọi là “chuỗi nặng” của phân tử Fab lai chéo.

Thuật ngữ “phân tử globulin miễn dịch” chỉ protein có cấu trúc của kháng thể có trong tự nhiên. Ví dụ, các globulin miễn dịch của lớp IgG là các glycoprotein heterotetrame bằng khoảng 150.000 dalton, gồm hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng là được liên kết disulfua. Từ đầu tận N đến đầu tận C, mỗi chuỗi nặng có vùng biến đổi (VH), còn được gọi là miền chuỗi nặng hoặc miền biến đổi chuỗi nặng, sau đó là ba miền không đổi (CH1, CH2, và CH3), còn được gọi là vùng không đổi chuỗi nặng. Tương tự, từ đầu tận N đến đầu tận C, mỗi chuỗi nhẹ có vùng biến đổi (VL), còn được gọi là miền biến đổi chuỗi nhẹ hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ, sau đó là miền không đổi chuỗi nhẹ (CL), còn được gọi là vùng không đổi chuỗi nhẹ. Chuỗi nặng của globulin miễn dịch có thể được gán cho một trong số năm kiểu, được gọi là α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG), hoặc μ (IgM), một số trong số đó có thể còn được chia thành các kiểu phụ, ví dụ γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) và α_2 (IgA₂). Chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch có thể được gán cho một trong số hai loại, được gọi là kappa (κ) và lambda (λ), dựa trên trình tự axit amin của miền không đổi của nó. Globulin miễn dịch chủ yếu chứa hai phân tử Fab và miền Fc, được liên kết thông qua vùng bản lề globulin miễn dịch.

Thuật ngữ “kháng thể” trong bản mô tả này được sử dụng theo nghĩa rộng nhất và bao gồm các cấu trúc kháng thể khác nhau, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, và các mảnh kháng thể miễn là chúng biểu hiện hoạt tính gắn kết kháng nguyên mong muốn.

“Mảnh kháng thể” chỉ phân tử không phải là kháng thể nguyên vẹn mà chứa một phần của kháng thể nguyên vẹn gắn kết kháng nguyên mà kháng thể nguyên vẹn gắn kết vào đó. Ví dụ về các mảnh kháng thể gồm nhưng không bị giới hạn ở Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, các kháng thể thể đôi, kháng thể thẳng, các phân tử kháng thể chuỗi đơn (ví dụ scFv), và kháng thể miền đơn. Để xem xét một số mảnh kháng thể nhất định, xem Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Để xem xét các mảnh scFv, ví dụ, xem Plückthun, trong The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); đồng thời xem WO 93/16185; và patent Mỹ số 5,571,894 và 5,587,458. Để mô tả về các mảnh Fab và F(ab')₂ chứa thụ thể hỗ trợ gắn kết các gốc epitop và có chu kỳ bán hủy in vivo gia tăng, xem patent Mỹ số 5,869,046. Các kháng thể thể đôi là các mảnh kháng thể với hai vị trí gắn kết kháng nguyên mà có thể có hóa trị hai hoặc đặc hiệu kép. Xem, ví dụ, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003); và Hollinger et al., Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993). Các kháng thể thể ba và các kháng thể thể bốn cũng được bộc lộ trong Hudson et al., Nat Med 9,

129-134 (2003). Kháng thể miền đơn là các mảnh kháng thể chứa tất cả hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nặng hoặc tất cả hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo các phương án nhất định, kháng thể miền đơn lẻ là kháng thể miền đơn lẻ ở người (Domantis, Inc., Waltham, MA; ví dụ, xem patent Mỹ số 6,248,516 B1). Các mảnh kháng thể có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật khác nhau, bao gồm nhưng không giới hạn ở sự tiêu hóa phân giải protein của kháng thể nguyên vẹn cũng như sự sản sinh bởi tế bào chủ tái tổ hợp (ví dụ E. coli hoặc thể thực khuẩn), như được nêu trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "miền gắn kết kháng nguyên" chỉ phần của kháng thể mà chứa vùng mà gắn kết đặc hiệu với là thể bổ sung vào phần hoặc tất cả kháng nguyên. Miền gắn kết kháng nguyên có thể được tạo ra bởi, ví dụ, một hoặc nhiều miền biến đổi kháng thể (còn được gọi là các vùng biến đổi kháng thể). Cụ thể là, miền gắn kết kháng nguyên chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL) và vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH).

Thuật ngữ "vùng biến đổi" hoặc "miền biến đổi" chỉ miền của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể mà liên quan trong việc gắn kết kháng thể với kháng nguyên. Các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (lần lượt là VH và VL) của kháng thể tự nhiên thông thường có các cấu trúc tương tự, với mỗi miền chứa bốn vùng khung bảo toàn (các FR) và ba vùng siêu biến (các HVR). Xem, ví dụ, Kindt et al., Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., trang 91 (2007). Miền VH hoặc VL đơn có thể là đủ để tạo ra độ đặc hiệu gắn kết kháng nguyên.

Thuật ngữ "vùng siêu biến" hoặc "HVR", trong bản mô tả này, chỉ mỗi trong các vùng của miền biến đổi kháng thể mà siêu biến theo trình tự và/hoặc dạng vòng được xác định bằng cấu trúc ("vòng siêu biến"). Thông thường, kháng thể bốn chuỗi tự nhiên bao gồm sáu HVR; ba trong VH (H1, H2, H3), và ba trong VL (L1, L2, L3). Các HVR thông thường bao gồm gốc axit amin từ vòng siêu biến và/hoặc từ các vùng xác định bổ thể (các CDR), các vùng xác định bổ thể bằng vùng biến đổi trình tự cao nhất và/hoặc liên quan trong việc nhận ra kháng nguyên. Với ngoại trừ CDR1 trong VH, các CDR thông thường bao gồm gốc axit amin mà tạo thành vòng siêu biến. Các vùng siêu biến (các HVR) còn được gọi là "các vùng xác định bổ thể" (các CDR), và các thuật ngữ này được sử dụng trong bản mô tả này thay thế lẫn nhau liên quan đến các phần của vùng biến đổi mà tạo thành vùng gắn kết kháng nguyên. Vùng cụ thể này đã được mô tả bởi Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983) và bởi Chothia et al., J Mol Biol 196:901-917 (1987), trong đó định nghĩa bao gồm sự chồng khớp hoặc các tập hợp con của gốc axit amin khi so sánh với nhau. Tuy nhiên, ứng dụng của định nghĩa dùng để chỉ CDR

của kháng thể hoặc các biến thể của chúng được dùng để chỉ là nằm trong phạm vi của thuật ngữ được xác định và được sử dụng trong bản mô tả này. Các gốc axit amin thích hợp mà bao gồm các CDR được xác định bằng mỗi trong các tài liệu đối chứng nêu trên được nêu dưới đây trong Bảng 1 khi so sánh. Số lượng gốc chính xác mà bao gồm CDR cụ thể sẽ biến đổi phụ thuộc vào trình tự và kích cỡ của CDR. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định theo cách thông thường là gốc này bao gồm CDR cụ thể được tạo vùng biến đổi trình tự axit amin của kháng thể.

BẢNG 1. Định nghĩa CDR ¹

CDR	Kabat	Chothia	AbM ²
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	24-34
V _L CDR2	50-56	50-52	50-56
V _L CDR3	89-97	91-96	89-97

¹ Đánh số của tất cả các định nghĩa CDR trong Bảng 1 là theo các quy ước đánh số được nêu bởi Kabat et al. (xem dưới đây).

² "AbM" có chữ in thường "b" như được sử dụng trong Bảng 1 chỉ các CDR được định nghĩa bằng phần mềm tạo mẫu kháng thể "AbM" của Oxford Molecular.

Kabat et al. cũng đã định nghĩa hệ đánh số cho các trình tự vùng biến đổi mà có khả năng áp dụng cho kháng thể bất kỳ. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể quy định một cách rõ ràng hệ "đánh số theo Kabat" này cho trình tự vùng biến đổi bất kỳ, mà không dựa vào các số liệu thử nghiệm bất kỳ ngoài chính trình tự đó. Trong bản mô tả này, "đánh số theo Kabat" chỉ hệ đánh số được nêu trong Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983). Trừ khi có quy định khác, tham khảo việc đánh số của các vị trí gốc axit amin đặc hiệu trong vùng biến đổi của kháng thể là theo hệ đánh số theo Kabat.

Các trình tự polypeptit của danh mục trình tự (tức là, SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 v.v.) không được đánh số theo đánh số theo Kabat. Tuy nhiên, đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật để chuyển việc đánh số của các trình tự của danh mục trình tự theo hệ đánh số theo Kabat.

"Khung" hoặc "FR" chỉ các gốc miền biến đổi không phải là các gốc vùng siêu biến (HVR). FR của miền biến đổi nhìn chung chứa bốn miền FR: FR1, FR2, FR3, và FR4. Do vậy, các trình tự HVR và FR thường xuất hiện trong trình tự sau trong VH (hoặc VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

"Lớp" của kháng thể hoặc globulin miễn dịch chỉ loại miền không đổi hoặc vùng không đổi mà chuỗi nặng của nó có. Có năm lớp kháng thể chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và một vài lớp trong số các lớp này có thể còn được chia thành các phân lớp (isotyp), ví dụ, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, và IgA₂. Miền không đổi chuỗi nặng tương ứng với các lớp khác nhau của các globulin miễn dịch lần lượt được ký hiệu là α , δ , ϵ , γ , và μ .

Thuật ngữ "miền Fc" hoặc "vùng Fc" trong bản mô tả này được dùng để xác định vùng tận cùng C của chuỗi nặng globulin miễn dịch chứa ít nhất một phần của vùng không đổi. Thuật ngữ này bao gồm các vùng Fc trình tự tự nhiên và các vùng Fc biến đổi. Mặc dù các ranh giới của vùng Fc của chuỗi nặng IgG có thể biến đổi nhẹ, vùng Fc chuỗi nặng IgG ở người thường được định nghĩa kéo dài từ Cys226, hoặc từ Pro230, đến đầu tận carboxyl của chuỗi nặng. Tuy nhiên, lysin đầu tận C (Lys447) của vùng Fc có thể có mặt hoặc không có mặt. Trừ khi có quy định khác trong bản mô tả này, việc đánh số gốc axit amin trong vùng Fc hoặc vùng không đổi là theo hệ đánh số theo EU, còn được gọi là chỉ số EU, như được nêu trong Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. "Cấu trúc siêu phân tử" của miền Fc trong bản mô tả này chỉ một trong hai polypeptit tạo miền dime Fc, tức là, polypeptit chứa các vùng không đổi đầu tận C của chuỗi nặng globulin miễn dịch, có khả năng tự liên kết ổn định. Ví dụ, cấu trúc siêu phân tử của miền Fc của IgG chứa miền không đổi IgG CH2 và IgG CH3.

"Việc cải biến thúc đẩy sự liên kết của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc" là sự thao tác của khung peptit hoặc sự biến đổi sau dịch mã của cấu trúc siêu phân tử của miền Fc mà làm giảm hoặc ngăn ngừa sự kết hợp của polypeptit chứa cấu trúc siêu phân tử của miền Fc với polypeptit giống nhau để tạo thành dime cùng loại. Biến đổi thúc đẩy sự liên kết như được sử dụng trong bản mô tả này cụ thể bao gồm những biến đổi riêng

được tạo ra đối với mỗi trong số hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc được mong đợi để liên kết (tức là, cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc), trong đó những biến đổi là thể bổ sung cho nhau sao cho để thúc đẩy sự gắn kết của hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Ví dụ, sự biến đổi thúc đẩy sự liên kết có thể làm biến đổi cấu trúc hoặc điện tích của một hoặc cả hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc để sao cho tạo ra sự gắn kết của chúng lần lượt trong không gian hoặc trong tính điện thích hợp. Như vậy, sự (hetero)dimer hóa xảy ra giữa polypeptit chứa cấu trúc siêu phân tử của miền Fc thứ nhất và polypeptit chứa cấu trúc siêu phân tử của miền Fc thứ hai, mà có thể không giống nhau theo nghĩa là thành phần khác được dung hợp với mỗi cấu trúc siêu phân tử (ví dụ gốc gắn kết kháng nguyên) là không giống nhau. Theo một số phương án, việc cải biến thúc đẩy sự liên kết bao gồm sự đột biến axit amin trong miền Fc, cụ thể là phần thể axit amin. Theo phương án cụ thể, việc cải biến thúc đẩy sự liên kết bao gồm sự đột biến axit amin riêng rẽ, cụ thể là phần thể axit amin, trong mỗi trong số hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc.

Thuật ngữ “các chức năng tác động” chỉ các chức năng hoạt tính sinh học được quy cho vùng Fc của kháng thể, mà biến đổi isotyp của kháng thể. Ví dụ về các chức năng tác động của kháng thể gồm: gắn kết C1q và độ độc hại tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC), gắn kết thụ thể Fc, độ độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP), sự tiết xytokin, sự hấp thu kháng nguyên do phức miễn dịch gây ra bởi các tế bào trình bày kháng nguyên, sự điều tiết giảm của các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ thụ thể tế bào B), và sự hoạt hóa tế bào B.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “thiết kế di truyền, được thiết kế di truyền, làm thiết kế di truyền”, được coi là bao gồm sự thao tác bất kỳ của khung peptit hoặc sự biến đổi sau dịch mã của polypeptit có trong tự nhiên hoặc tái tổ hợp hoặc mảnh của chúng. Làm thiết kế di truyền bao gồm sự biến đổi của trình tự axit amin, của kiểu glycosyl hóa, hoặc của nhóm mạch bên của các axit amin riêng rẽ, cũng như sự kết hợp của những phương pháp này.

Thuật ngữ “sự biến đổi axit amin” trong bản mô tả này có nghĩa là bao gồm sự thay thế, khuyết, cài xen, và sự biến đổi axit amin. Dạng kết hợp bất kỳ của sự thay thế, khuyết, cài xen, và biến đổi có thể được thực hiện để đạt được cấu trúc cuối cùng, với điều kiện là cấu trúc cuối cùng có các đặc tính mong muốn, ví dụ, gắn kết với thụ thể Fc giảm, hoặc gắn kết với peptit khác tăng. Sự khuyết và cài xen trình tự axit amin bao gồm sự khuyết và cài xen đầu tận amino và/hoặc carboxy của các axit amin. Sự biến đổi các axit amin cụ thể là các phần thể axit amin. Cho mục đích biến đổi, ví dụ các đặc tính gắn kết của vùng Fc, phần thể axit amin không bảo toàn, tức là, thay thế một axit amin bằng một axit amin khác có các đặc

tính cấu trúc và/hoặc hóa học khác nhau, là được đặc biệt ưu tiên. Phần thể axit amin bao gồm sự thay thế bằng các axit amin không có trong tự nhiên hoặc bằng các dẫn xuất axit amin có trong tự nhiên của hai mươi axit amin tiêu chuẩn (ví dụ 4-hydroxyprolin, 3-methylhistidin, ornithin, homoserin, 5-hydroxylysin). Sự biến đổi các axit amin có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp di truyền hoặc hóa học đã được biết rõ trong lĩnh vực. Các phương pháp di truyền có thể bao gồm đột biến định hướng điểm, PCR, tổng hợp gen và phương pháp tương tự. Được dự tính là các phương pháp làm biến đổi nhóm mạch bên của axit amin bằng các phương pháp không phải là phương pháp làm thiết kế di truyền, như sự biến đổi hóa học, cũng có thể hữu ích. Các ký hiệu khác nhau có thể được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ cùng một sự biến đổi axit amin. Ví dụ, sự thay thế từ prolin ở vị trí 329 của miền Fc thành glyxin có thể được ký hiệu là 329G, G329, G₃₂₉, P329G, hoặc Pro329Gly.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "polypeptit" chỉ phân tử gồm monome (các axit amin) được liên kết thẳng hàng bởi các liên kết amit (cũng được biết là các liên kết peptit). Thuật ngữ "polypeptit" chỉ mạch bất kỳ của hai hoặc nhiều axit amin, và không dùng để chỉ độ dài cụ thể của sản phẩm. Như vậy, các peptit, các dipeptit, các tripeptit, các oligopeptit, "protein," "mạch axit amin," hoặc thuật ngữ khác bất kỳ được dùng để chỉ mạch của hai hoặc nhiều axit amin, được bao gồm trong định nghĩa của "polypeptit," và thuật ngữ "polypeptit" có thể được sử dụng thay cho, hoặc thay thế cho thuật ngữ bất kỳ trong số các thuật ngữ này. Thuật ngữ "polypeptit" cũng được dự định để chỉ các sản phẩm của những biến đổi sau biểu hiện của polypeptit, bao gồm nhưng không giới hạn ở sự glycosyl hóa, sự axetyl hóa, sự phosphoryl hóa, sự amit hóa, sự dẫn xuất hóa bởi các nhóm bảo vệ /phong bế đã biết, phân tách protein phân giải, hoặc sự biến đổi bằng các axit amin không có trong tự nhiên. Polypeptit có thể thu được từ nguồn sinh học tự nhiên hoặc được tạo ra bằng kỹ thuật tái tổ hợp, nhưng không cần được dịch mã từ trình tự axit amin được thiết kế. Nó có thể được tạo ra theo cách bất kỳ, bao gồm bằng cách tổng hợp hóa học. Polypeptit được bộc lộ ở đây có thể có kích cỡ bằng khoảng 3 axit amin hoặc nhiều hơn, 5 axit amin hoặc nhiều hơn, 10 axit amin hoặc nhiều hơn, 20 axit amin hoặc nhiều hơn, 25 axit amin hoặc nhiều hơn, 50 axit amin hoặc nhiều hơn, 75 axit amin hoặc nhiều hơn, 100 axit amin hoặc nhiều hơn, 200 axit amin hoặc nhiều hơn, 500 axit amin hoặc nhiều hơn, 1.000 axit amin hoặc nhiều hơn, hoặc 2.000 axit amin hoặc nhiều hơn. Các polypeptit có thể được xác định cấu trúc không gian ba chiều mặc dù chúng không cần có cấu trúc này. Các polypeptit có cấu trúc không gian ba chiều được xác định được đề cập đến là được gấp cuộn, và các polypeptit mà không có cấu

trúc ba chiều được xác định, thay vào đó có thể chấp nhận một số lượng lớn của các hình dạng khác nhau, và được gọi là không được gấp cuộn.

Thuật ngữ polypeptit "được phân lập" hoặc biến thể, hoặc dẫn xuất của nó được dùng để chỉ polypeptit mà không ở trong môi trường tự nhiên của nó. Không yêu cầu mức tinh chế đặc biệt. Ví dụ, polypeptit được phân lập có thể được loại bỏ khỏi môi trường tự nhiên hoặc nguyên thủy của nó. Các polypeptit được sản xuất theo phương pháp tái tổ hợp và các protein được biểu hiện trong tế bào chủ được xem là được phân lập cho mục đích được bộc lộ ở đây, là các polypeptit tự nhiên hoặc tái tổ hợp mà đã được tách ra, được cắt phân đoạn, hoặc được tinh chế một phần hoặc hầu hết bằng kỹ thuật thích hợp bất kỳ.

"Phần trăm (%) độ tương đồng trình tự axit amin" liên quan đến trình tự polypeptit viện dẫn được xác định bằng phần trăm của gốc axit amin trong trình tự ứng viên mà giống với gốc axit amin trong trình tự polypeptit viện dẫn, sau khi sắp thẳng hàng các trình tự và đưa các khe hở, nếu cần, để đạt được phần trăm độ tương đồng trình tự tối đa, và không xem xét sự thay thế bảo toàn bất kỳ như là một phần của độ tương đồng trình tự. Sự sắp thẳng hàng cho các mục đích xác định phần trăm độ tương đồng trình tự axit amin có thể đạt được theo các cách khác nhau mà thuộc lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, sử dụng phần mềm máy tính có sẵn trên thị trường như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNA STAR). Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể xác định các thông số thích hợp để sắp thẳng hàng các trình tự, bao gồm các thuật toán bất kỳ cần để đạt được sự sắp thẳng hàng tối đa so với toàn bộ chiều dài của các trình tự được so sánh. Cho các mục đích trong bản mô tả này, tuy nhiên, % giá trị độ tương đồng trình tự axit amin được tạo ra sử dụng chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2. Chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2 được ủy quyền bởi Genentech, Inc., và mã nguồn đã được nộp cùng với tài liệu cho người sử dụng ở Cục Bản Quyền Mỹ (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, nơi nó được đăng ký theo bản quyền Mỹ, số đăng ký TXU510087. Chương trình ALIGN-2 có thể mua được của Genentech, Inc., South San Francisco, California, hoặc có thể được biên tập từ mã nguồn. Chương trình ALIGN-2 cần được biên soạn để sử dụng trên hệ vận hành UNIX, bao gồm UNIX V4.0D dạng số. Tất cả các thông số so sánh trình tự được thiết lập bằng chương trình ALIGN-2 và không biến đổi. Trong các trường hợp trong đó ALIGN-2 được sử dụng để so sánh trình tự axit amin, % độ tương đồng trình tự axit amin của trình tự axit amin A đã nêu đối với, với, hoặc dựa vào trình tự axit amin B đã nêu (mà theo cách khác có thể được gọi là trình tự axit amin A đã nêu mà có hoặc bao gồm % độ tương đồng trình tự axit amin nhất định đối với, với, hoặc dựa vào trình tự axit amin B đã nêu) được tính như sau:

trong đó X là số lượng gốc axit amin được ghi điểm bằng các cặp giống nhau bằng chương trình sắp thẳng hàng trình tự ALIGN-2 trong sự sắp thẳng hàng A và B của chương trình đó, và trong đó Y là tổng số gốc axit amin trong B. Sẽ được đánh giá rằng khi chiều dài của trình tự axit amin A không bằng chiều dài của trình tự axit amin B, thì % độ tương đồng trình tự axit amin của A so với B sẽ không bằng % độ tương đồng trình tự axit amin của B so với A. Trừ khi có quy định khác, tất cả % các giá trị độ tương đồng trình tự axit amin được sử dụng trong bản mô tả này thu được như được nêu trong đoạn ngay trên sử dụng chương trình máy tính ALIGN-2.

Thuật ngữ "polynucleotit" chỉ phân tử hoặc cấu trúc axit nucleic được phân lập, ví dụ ARN thông tin (mARN), ARN thu được từ virus, hoặc ADN plasmid (pADN). Polynucleotit có thể bao gồm liên kết phosphodiester thông thường hoặc liên kết không thông thường (ví dụ liên kết amit, như được tìm thấy trong các axit nucleic peptit (PNA). Thuật ngữ "phân tử axit nucleic" chỉ một hoặc nhiều đoạn axit nucleic bất kỳ, ví dụ các mảnh ADN hoặc ARN, có mặt trong polynucleotit.

Thuật ngữ phân tử axit nucleic "được phân lập" hoặc polynucleotit được dùng để chỉ phân tử axit nucleic, ADN hoặc ARN, mà đã được loại bỏ khỏi môi trường tự nhiên của nó. Ví dụ, polynucleotit tái tổ hợp mã hóa cho polypeptit chứa trong vectơ được coi là được phân lập cho các mục đích mô tả sáng chế. Các ví dụ khác về polynucleotit được phân lập bao gồm polynucleotit tái tổ hợp được duy trì trong tế bào chủ khác loại hoặc được tinh chế (một phần hoặc hầu như hoàn toàn) polynucleotit trong dung dịch. Polynucleotit được phân lập bao gồm phân tử polynucleotit chứa trong tế bào mà thông thường chứa phân tử polynucleotit, nhưng phân tử polynucleotit có mặt ở vị trí ngoài nhiễm sắc thể hoặc ở nhiễm sắc thể mà khác với vị trí nhiễm sắc thể tự nhiên của nó. Các phân tử ARN được phân lập bao gồm các phiên mã ARN *in vivo* hoặc *in vitro* được bộc lộ ở đây, cũng như các dạng dài dương tính và âm tính, và các dạng dài kép. Polynucleotit hoặc axit nucleic được phân lập được bộc lộ ở đây còn bao gồm các phân tử được tạo ra bằng cách tổng hợp này. Ngoài ra, polynucleotit hoặc axit nucleic có thể là hoặc có thể gồm yếu tố điều hòa như gen khởi đầu, vị trí gắn kết ribosom, hoặc gen kết thúc phiên mã.

Thuật ngữ axit nucleic hoặc polynucleotit có trình tự nucleotit, "giống hệt" ví dụ, ít nhất 95% với trình tự nucleotit viện dẫn được bộc lộ ở đây, được dự định là trình tự nucleotit của polynucleotit là giống hệt với trình tự viện dẫn ngoại trừ trình tự polynucleotit có thể bao gồm lên đến năm điểm đột biến cho mỗi 100 nucleotit của trình tự nucleotit viện dẫn. Theo

cách khác, để thu được polynucleotit có trình tự nucleotit ít nhất 95% giống hệt với trình tự nucleotit viện dẫn, lên đến 5% số nucleotit trong trình tự tham khảo có thể được làm khuyết hoặc được thay thế bằng một nucleotit khác, hoặc số nucleotit lên đến 5% trong tổng số nucleotit trong trình tự tham khảo có thể là được cài xen vào trình tự tham khảo. Sự biến đổi này của trình tự tham khảo có thể xuất hiện ở những vị trí tận cùng 5' hoặc 3' của trình tự nucleotit viện dẫn hoặc vị trí bất kỳ giữa các vị trí tận cùng này, được đặt rải rác riêng biệt giữa các gốc trong trình tự tham khảo hoặc trong một hoặc nhiều nhóm tiếp giáp trong trình tự tham khảo. Để làm đối tượng thực tế, liệu trình tự polynucleotit cụ thể bất kỳ giống nhau ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự nucleotit được bộc lộ ở đây có thể được xác định một cách thuận tiện bằng cách sử dụng các chương trình máy tính đã biết, như các chương trình được mô tả ở trên đối với các polypeptit (ví dụ ALIGN-2).

Thuật ngữ "caxet biểu hiện" chỉ polynucleotit được tạo ra bằng cách tái tổ hợp hoặc tổng hợp, với một loạt thành phần axit nucleic được cụ thể hóa cho phép sự phiên mã của axit nucleic cụ thể trong tế bào đích. Caxet biểu hiện tái tổ hợp có thể được kết hợp thành plasmid, nhiễm sắc thể, ADN ty thể, ADN plastit, virus, hoặc mảnh axit nucleic. Thông thường, phần caxet biểu hiện tái tổ hợp của vector biểu hiện bao gồm, trong số các trình tự khác, trình tự axit nucleic cần được phiên mã và gen khởi đầu. Theo các phương án nhất định, caxet biểu hiện được bộc lộ ở đây chứa trình tự polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép được bộc lộ ở đây hoặc các mảnh của chúng.

Thuật ngữ "vector" hoặc "vector biểu hiện" là đồng nghĩa với "cấu trúc biểu hiện" và dùng để chỉ phân tử ADN được sử dụng để đưa vào và định hướng sự biểu hiện của gen đặc hiệu mà được liên kết điều khiển được trong tế bào đích. Thuật ngữ này bao gồm vector là cấu trúc axit nucleic tự sao chép cũng như vector được đưa vào hệ gen của tế bào chủ mà nó được đưa vào. Vector biểu hiện được bộc lộ ở đây chứa caxet biểu hiện. Vector biểu hiện cho phép sự phiên mã một lượng lớn ARN thông tin ổn định. Ngay khi vector biểu hiện ở bên trong là tế bào đích bên trong, phân tử axit ribonucleic hoặc protein được mã hóa bởi gen này được sản xuất bằng cơ chế sự phiên mã tế bào và/hoặc dịch mã tế bào. Theo một phương án, vector biểu hiện được bộc lộ ở đây chứa caxet biểu hiện mà chứa trình tự polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép được bộc lộ ở đây hoặc các mảnh của chúng.

Thuật ngữ "tế bào chủ", "dòng tế bào chủ," và "môi trường nuôi cấy tế bào chủ" được sử dụng biến đổi lẫn nhau và dùng để chỉ tế bào mà axit nucleic ngoại sinh đã được đưa vào đó, bao gồm con cháu của tế bào này. Các tế bào chủ bao gồm "thể biến đổi" và "các tế bào được biến đổi," bao gồm tế bào được biến đổi sơ cấp và con cháu thu được từ đó mà không

liên quan đến số lần cấy chuyển. Con cháu có thể không hoàn toàn giống hệt về hàm lượng axit nucleic đối với tế bào cha mẹ, nhưng có thể chứa các đột biến. Con cháu đột biến mà có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học như được sàng lọc hoặc được chọn đối với tế bào được biến đổi ban đầu được bao gồm trong bản mô tả này. Một tế bào chủ là loại bất kỳ của hệ tế bào mà có thể được sử dụng để tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép được bộc lộ ở đây. Tế bào chủ bao gồm tế bào được nuôi cấy, ví dụ tế bào động vật có vú được nuôi cấy, như tế bào CHO, tế bào BHK, tế bào NS0, tế bào SP2/0, tế bào u tủy YO, P3X63 tế bào u tủy ở chuột, tế bào PER, tế bào PER.C6 hoặc tế bào lai, tế bào nấm men, tế bào côn trùng, và tế bào thực vật, chỉ kể ra một số ít tế bào, mà cả các tế bào được bao gồm trong động vật chuyển gen, thực vật chuyển gen hoặc cây trồng được nuôi cấy hoặc mô động vật.

“Thụ thể Fc hoạt hóa” là thụ thể Fc mà gắn kết sau đó bởi miền Fc của kháng thể tạo ra các tín hiệu mà kích thích tế bào mang thụ thể để thực hiện các chức năng tác động. Thụ thể Fc hoạt hóa ở người bao gồm FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), và FcαRI (CD89).

Độ độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) là cơ chế miễn dịch dẫn đến việc làm tan các tế bào đích được phủ kháng thể bằng tế bào tác động miễn dịch. Các tế bào đích là các tế bào mà các kháng thể hoặc các dẫn xuất của chúng bao gồm vùng Fc gắn kết đặc hiệu, thông thường thông qua phần protein tức là đầu tận N với vùng Fc. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “ADCC giảm” được xác định bằng sự giảm số tế bào đích mà được làm tan trong thời gian đã định, ở hàm lượng của kháng thể đã định trong môi trường xung quanh tế bào đích, bằng cơ chế ADCC được xác định ở trên, và/hoặc tăng hàm lượng của kháng thể trong môi trường xung quanh tế bào đích, cần để đạt được sự phân giải số tế bào đích đã định trong thời gian đã định, bằng cơ chế của ADCC. Sự giảm ADCC so với ADCC được điều tiết bởi cùng kháng thể được tạo ra bởi cùng loại tế bào chủ, sử dụng các phương pháp sản xuất, tinh chế, tạo công thức và lưu giữ tiêu chuẩn giống nhau (mà đã được người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật biết rõ), nhưng chưa được thiết kế di truyền. Ví dụ sự giảm ADCC được điều tiết bởi kháng thể bao gồm trong miền Fc của nó phần thể axit amin mà làm giảm ADCC, so với ADCC được điều tiết bởi cùng một kháng thể mà không có phần thể axit amin này trong miền Fc. Thử nghiệm thích hợp để đo ADCC là đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, xem công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2006/082515 hoặc công bố đơn sáng chế quốc tế số WO2012/130831).

"Lượng hữu hiệu" của một chất dùng để chỉ lượng cần thiết để dẫn đến biến đổi sinh lý trong tế bào hoặc mô mà nó được dùng.

"Lượng cho tác dụng điều trị bệnh" của một chất, ví dụ, dược phẩm, dùng để chỉ lượng hữu hiệu, ở liều lượng và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả điều trị hoặc phòng ngừa bệnh mong muốn. Lượng cho tác dụng điều trị bệnh của một chất, ví dụ, loại bỏ, làm giảm, làm chậm, tối thiểu hóa hoặc ngăn ngừa các tác dụng phụ của bệnh.

"Cá thể" hoặc "đối tượng" là động vật có vú. Động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, động vật thuần hóa (ví dụ, bò, cừu, mèo, chó, và ngựa), động vật linh trưởng (ví dụ người và động vật linh trưởng không phải người như khỉ), thỏ, và loài gặm nhấm (ví dụ chuột nhắt và chuột cống). Đặc biệt là, cá thể hoặc đối tượng này là người.

Thuật ngữ "dược phẩm" dùng để chỉ chế phẩm dưới dạng như vậy để cho phép hoạt tính sinh học của thành phần hoạt tính được chứa trong đó hữu hiệu, và không chứa thành phần bổ sung mà gây độc không chấp nhận được cho đối tượng sẽ dùng dược phẩm này.

"Chất mang dược dụng" chỉ thành phần trong dược phẩm, không phải là thành phần hoạt tính, mà không độc cho đối tượng. Chất mang dược dụng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, chất đệm, tá dược, chất làm ổn định, hoặc chất bảo quản.

Trong bản mô tả này, "điều trị" (và các biến thể của chúng như "điều trị" hoặc "việc điều trị") dùng để chỉ sự can thiệp lâm sàng với nỗ lực làm biến đổi quá trình bệnh tự nhiên ở cá thể được điều trị, và có thể được tiến hành để phòng bệnh hoặc trong quá trình bệnh lý lâm sàng. Tác dụng điều trị mong muốn bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, ngăn ngừa sự xuất hiện hoặc sự tái phát của bệnh, sự thuyên giảm của các triệu chứng, sự suy giảm các hậu quả bệnh lý trực tiếp hoặc gián tiếp bất kỳ của bệnh, ngăn ngừa di căn, giảm tốc độ tiến triển bệnh, thuyên giảm hoặc dịu tình trạng bệnh lý, và thuyên giảm hoặc chặn đoán được cải thiện. Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây được dùng để làm chậm sự phát triển của bệnh hoặc làm chậm sự tiến triển bệnh.

Thuật ngữ "tờ rời trong bao gói" được sử dụng để chỉ các chỉ dẫn thường được bao gồm trong bao gói sản phẩm điều trị bệnh bán trên thị trường, chứa thông tin về chỉ định, sử dụng, liều lượng, cách dùng, liệu pháp kết hợp, chống chỉ định và/hoặc lưu ý liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm điều trị bệnh.

Sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai, một trong số đó là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T và gốc còn lại là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, và miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai có khả năng kết hợp ổn định;

trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là

- (a) phân tử mạch đơn Fab, trong đó chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được nối bằng liên kết peptit, hoặc
- (b) phân tử Fab lai chéo trong đó vùng biến đổi hoặc vùng không đổi của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được chuyển đổi.

Các dạng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T

Thành phần của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được dung hợp với nhau trong một loại các cấu hình. Các cấu hình minh họa được mô tả trên Fig.1.

Theo một số phương án, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc.

Trong phương án cụ thể này, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai. Theo phương án cụ thể này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T về cơ bản chứa gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai, miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai, và tùy chọn một hoặc nhiều liên kết peptit, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai, và gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc. Theo các phương án cụ thể hơn, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab mạch đơn. Theo cách khác, theo phương án cụ thể, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo. Tùy chọn, nếu gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo, chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai còn có thể được dung hợp với nhau.

Theo phương án thay thế của phương án này, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc. Theo phương án cụ thể này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T về cơ bản chứa gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai, miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai, và tùy chọn một hoặc nhiều liên kết peptit, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai được dung hợp với nhau ở

đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của một trong số các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Theo các phương án cụ thể hơn, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab mạch đơn. Theo cách khác, theo một phương án cụ thể, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo.

Theo phương án khác nữa, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp ở đầu tận C của chuỗi nhẹ Fab với đầu tận N của chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất. Theo phương án cụ thể này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T về cơ bản chứa gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai, miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai, và tùy chọn một hoặc nhiều liên kết peptit, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp tại đầu tận N của chuỗi nhẹ Fab vào đầu tận C của chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai, và gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc. Theo các phương án cụ thể hơn, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo.

Theo các phương án khác, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc.

Trong phương án cụ thể này, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất. Theo phương án cụ thể này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T về cơ bản chứa gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai, miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai, và tùy chọn một hoặc nhiều liên kết peptit, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất, và gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc. Theo một phương án cụ thể hơn, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo. Tùy chọn, chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai còn có thể được dung hợp với nhau.

Theo một cụ thể của các phương án này, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T. Theo các phương án khác, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích.

Gốc gắn kết kháng nguyên có thể được dung hợp với miền Fc hoặc với nhau một cách trực tiếp hoặc thông qua liên kết peptit, chứa một hoặc nhiều axit amin, thông thường khoảng từ 2 đến 20 axit amin. Các tác nhân liên kết peptit đã được biết trong lĩnh vực và được mô tả trong bản mô tả này. Các tác nhân liên kết peptit không gây miễn dịch thích hợp gồm, ví dụ, các tác nhân liên kết peptit $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ hoặc $G_4(SG_4)_n$. “n” thường là một số nằm trong khoảng từ 1 đến 10, thường nằm trong khoảng từ 2 đến 4. Liên kết peptit đặc biệt thích hợp để dung hợp các chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai với nhau là $(G_4S)_2$. Liên kết peptit minh họa thích hợp để nối các chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai là EPKSC(D)- $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO 150 và 151). Ngoài ra, các liên kết có thể bao gồm (một phần của) vùng bản lề globulin miễn dịch. Cụ thể trong đó gốc gắn kết kháng nguyên được dung hợp với đầu tận N của cấu trúc siêu phân tử của miền Fc nó có thể được dung hợp thông qua vùng bản lề globulin miễn dịch hoặc một phần của nó, có hoặc không có liên kết peptit khác.

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T với gốc gắn kết kháng nguyên duy nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích (ví dụ như được thể hiện trên Fig. 1A, 1B, 1D, 1E, 1H, 1I, 1K hoặc 1M) là hữu ích, cụ thể trong các trường hợp trong đó sự đồng hóa của kháng nguyên tế bào đích được mong đợi theo theo gắn kết của gốc gắn kết kháng nguyên ái lực cao. Trong các trường hợp này, sự có mặt của trên một gốc gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đối với kháng nguyên tế bào đích có thể làm tăng cường sự đồng hóa của kháng nguyên tế bào đích, nhờ đó giảm lợi ích của nó.

Trong nhiều trường hợp khác, tuy nhiên, sẽ có lợi nếu có phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa hai hoặc nhiều gốc gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đối với kháng nguyên tế bào đích (xem các ví dụ được thể hiện trên các hình vẽ Fig. 1C, 1F, 1G, 1J hoặc 1L), ví dụ để làm tối ưu hóa việc tạo đích vào vị trí đích hoặc để cho phép liên kết chéo các kháng nguyên tế bào đích.

Do vậy, theo các phương án nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây còn bao gồm gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với cùng kháng nguyên tế bào đích là gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất hoặc thứ hai. Theo một phương án cụ thể, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T, và gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích.

Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc. Theo một phương án cụ thể, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba được dung hợp ở đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của một trong số các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc, và gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai. Theo một phương án như vậy, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab mạch đơn. Trong phương án cụ thể này, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo. Tùy chọn, nếu gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo, chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai còn có thể được dung hợp với nhau.

Gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có thể được dung hợp với miền Fc một cách trực tiếp hoặc thông qua liên kết peptit. Theo một phương án cụ thể, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba mỗi gốc được dung hợp với miền Fc qua vùng bản lề globulin miễn dịch. Theo phương án cụ thể, vùng bản lề globulin miễn dịch là vùng bản lề IgG1 ở người. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba và miền Fc là một phần của phân tử globulin miễn dịch. Theo một phương án cụ thể, phân tử globulin miễn dịch là globulin miễn dịch lớp IgG. Theo một phương án cụ thể hơn nữa, globulin miễn dịch là globulin miễn dịch phân phân lớp IgG1. Theo phương án khác globulin miễn dịch là globulin miễn dịch phân phân lớp IgG4. Theo một phương án cụ thể khác, globulin miễn dịch là globulin miễn dịch ở người. Theo các phương án khác, globulin miễn dịch là globulin miễn dịch thể khảm hoặc globulin miễn dịch được người hóa. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T về cơ bản chứa phân tử globulin miễn dịch có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, và gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên là phân tử Fab mạch đơn hoặc phân tử Fab lai chéo, cụ thể là phân tử Fab lai chéo, được dung hợp với đầu tận N của một trong số các chuỗi nặng globulin miễn dịch, tùy chọn thông qua liên kết peptit.

Theo phương án khác, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ ba được dung hợp ở đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của một trong số các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc, và gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất. Theo phương án cụ thể này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T về cơ bản chứa,

gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất, thứ hai và thứ ba, miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai, và tùy chọn một hoặc nhiều liên kết peptit, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất, và gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc, và trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc. Theo phương án cụ thể này, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo. Tùy chọn, chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai còn có thể được dung hợp với nhau.

Trong một số phân tử trong các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây, chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp với nhau, tùy chọn thông qua liên kết peptit. Phụ thuộc vào cấu hình của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai, chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có thể được dung hợp ở đầu tận C của nó với đầu tận N của chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai, hoặc chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai có thể được dung hợp ở đầu tận C của nó với đầu tận N của chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất. Sự dung hợp của các chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai còn làm giảm sự mất cặp của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab không đối xứng, và cũng làm giảm số plasmit cần để biểu hiện một số trong số các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây.

Theo các phương án nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit, trong đó chuỗi nhẹ Fab thứ nhất cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với liên kết peptit, mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với chuỗi nặng Fab thứ nhất, mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc (VL-CL-liên kết-VH-CH1-CH2-CH2(-CH4)), và polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab thứ hai cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc (VH-CH1-CH2-CH3(-CH4)). Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit chuỗi nhẹ Fab thứ hai (VL-CL). Theo các phương án nhất định, các polypeptit được liên kết cộng hóa trị, ví dụ, bằng liên kết disulfua.

Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit, trong đó chuỗi nhẹ Fab thứ nhất cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với liên kết peptit, mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với chuỗi nặng Fab thứ nhất, mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với chuỗi nặng Fab thứ hai, mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc (VL-CL-liên kết-VH-CH1-VH-CH1-CH2-CH3(-CH4)). Trong một trong các phương án này đó là phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit chuỗi nhẹ Fab thứ hai (VL-CL). Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo các phương án này có thể còn bao gồm (i) polypeptit cấu trúc siêu phân tử của miền Fc (CH2-CH3(-CH4)), hoặc (ii) polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab thứ ba cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc (VH-CH1-CH2-CH3(-CH4)) và polypeptit chuỗi nhẹ Fab thứ ba (VL-CL). Theo các phương án nhất định, các polypeptit được liên kết cộng hóa trị, ví dụ, bằng liên kết disulfua.

Theo các phương án nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab thứ nhất cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi của chuỗi nặng Fab thứ nhất (tức là, chuỗi nặng Fab lai chéo, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng vùng biến đổi chuỗi nhẹ), mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc (VL-CH1-CH2-CH2(-CH4)), và polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab thứ hai cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc (VH-CH1-CH2-CH3(-CH4)). Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit, trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi của chuỗi nhẹ Fab (VH-CL) và polypeptit của chuỗi nhẹ Fab (VL-CL). Theo các phương án nhất định, các polypeptit được liên kết cộng hóa trị, ví dụ, bằng liên kết disulfua.

Theo các phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng Fab thứ nhất cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi chuỗi nhẹ Fab thứ nhất (tức là, chuỗi nặng Fab lai chéo, trong đó vùng không đổi chuỗi nặng được thay thế bằng vùng không đổi chuỗi nhẹ), mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc (VH-CL-CH2-CH2(-CH4)), và polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab thứ hai cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc (VH-CH1-CH2-

CH3(-CH4)). Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi chuỗi nặng Fab (VL-CH1) và polypeptit của chuỗi nhẹ Fab (VL-CL). Theo các phương án nhất định, các polypeptit được liên kết cộng hóa trị, ví dụ, bằng liên kết disulfua.

Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab thứ nhất cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi của chuỗi nặng Fab thứ nhất (tức là, chuỗi nặng Fab lai chéo, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng vùng biến đổi chuỗi nhẹ), mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với chuỗi nặng Fab thứ hai, mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc (VL-CH1-VH-CH1-CH2-CH3(-CH4)). Theo các phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng Fab thứ nhất cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi chuỗi nhẹ Fab thứ nhất (tức là, chuỗi nặng Fab lai chéo, trong đó vùng không đổi chuỗi nặng được thay thế bằng vùng không đổi chuỗi nhẹ), mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với chuỗi nặng Fab thứ hai, mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc (VH-CL-VH-CH1-CH2-CH3(-CH4)). Theo các phương án khác nữa, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab thứ hai cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab thứ nhất mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi của chuỗi nặng Fab thứ nhất (tức là, chuỗi nặng Fab lai chéo, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng vùng biến đổi chuỗi nhẹ), mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc (VH-CH1-VL-CH1-CH2-CH3(-CH4)). Theo các phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab thứ hai cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng biến đổi chuỗi nặng Fab thứ nhất mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi chuỗi nhẹ Fab thứ nhất (tức là, chuỗi nặng Fab lai chéo, trong đó vùng không đổi chuỗi nặng được thay thế bằng vùng không đổi chuỗi nhẹ), mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc (VH-CH1-VH-CL-CH2-CH3(-CH4)).

Trong một số phương án trong các phương án này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit của chuỗi nhẹ Fab lai chéo, trong đó vùng

biến đổi của chuỗi nặng Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi của chuỗi nhẹ Fab (VH-CL), và polypeptit của chuỗi nhẹ Fab (VL-CL). Trong số các phương án khác của các phương án này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit của chuỗi nhẹ Fab lai chéo, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi chuỗi nặng Fab (VL-CH1), và polypeptit của chuỗi nhẹ Fab (VL-CL). Theo các phương án khác của các phương án này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi chuỗi nặng Fab mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với polypeptit của chuỗi nhẹ Fab (VL-CH1-VL-CL), polypeptit trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi của chuỗi nhẹ Fab mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với polypeptit của chuỗi nhẹ Fab (VH-CL-VL-CL), polypeptit trong đó polypeptit của chuỗi nhẹ Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi chuỗi nặng Fab (VL-CL-VL-CH1), hoặc polypeptit trong đó polypeptit của chuỗi nhẹ Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng biến đổi của chuỗi nặng Fab mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi của chuỗi nhẹ Fab (VL-CL-VH-CL).

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo các phương án này có thể còn bao gồm (i) polypeptit cấu trúc siêu phân tử của miền Fc (CH2-CH3(-CH4)), hoặc (ii) polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab thứ ba cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc (VH-CH1-CH2-CH3(-CH4)) và polypeptit chuỗi nhẹ Fab thứ ba (VL-CL). Theo các phương án nhất định, các polypeptit được liên kết cộng hóa trị, ví dụ, bằng liên kết disulfua.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit trong đó chuỗi nhẹ Fab thứ hai cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab thứ nhất mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi của chuỗi nặng Fab thứ nhất (tức là, chuỗi nhẹ Fab lai chéo, trong đó vùng không đổi chuỗi nhẹ được thay thế bằng vùng không đổi chuỗi nặng) (VL-CL-VL-CH1), polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab thứ hai cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc (VH-CH1-CH2-CH3(-CH4)), và polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng Fab thứ nhất cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi chuỗi nhẹ Fab thứ nhất (VH-CL). Theo phương án khác,

phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit trong đó chuỗi nhẹ Fab thứ hai cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng biến đổi chuỗi nặng Fab thứ nhất mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi chuỗi nhẹ Fab thứ nhất (tức là, chuỗi nhẹ Fab lai chéo, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thay thế bằng vùng biến đổi chuỗi nặng) (VL-CL-VH-CL), polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab thứ hai cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc (VH-CH1-CH2-CH3(-CH4)), và polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab thứ nhất cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi của chuỗi nặng Fab thứ nhất (VL-CH1). Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo các phương án này có thể còn bao gồm (i) polypeptit cấu trúc siêu phân tử của miền Fc (CH2-CH3(-CH4)), hoặc (ii) polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab thứ ba cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc (VH-CH1-CH2-CH3(-CH4)) và polypeptit chuỗi nhẹ Fab thứ ba (VL-CL). Theo các phương án nhất định, các polypeptit được liên kết cộng hóa trị, ví dụ, bằng liên kết disulfua.

Theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên, các thành phần của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (ví dụ gốc gắn kết kháng nguyên, miền Fc) có thể được dung hợp trực tiếp hoặc qua các liên kết khác nhau, cụ thể là liên kết peptit chứa một hoặc nhiều axit amin, thông thường khoảng 2-20 axit amin, mà được mô tả trong bản mô tả này hoặc đã được biết trong lĩnh vực. Liên kết peptit không gây miễn dịch thích hợp gồm, ví dụ, $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ hoặc $G_4(SG_4)_n$ liên kết peptit, trong đó n thường là số nằm trong khoảng từ 1 đến 10, thường là nằm trong khoảng từ 2 đến 4.

Miền Fc

Miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa cặp chuỗi polypeptit bao gồm các miền chuỗi nặng của phân tử globulin miễn dịch. Ví dụ, miền Fc của phân tử globulin miễn dịch G (IgG) là dime, mỗi cấu trúc siêu phân tử của chúng chứa miền không đổi chuỗi nặng IgG của CH2 và CH3. Hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc có khả năng kết hợp ổn định với nhau. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây bao gồm không quá một miền Fc.

Theo một phương án, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T là miền Fc của IgG. Theo phương án cụ thể, miền Fc là miền Fc của IgG1. Theo phương án khác, miền Fc là miền Fc của IgG₄. Theo phương án cụ thể hơn, miền Fc là miền Fc của IgG₄ bao gồm phần thể axit amin ở vị trí S228 (đánh số theo EU), cụ thể là phần thể axit amin S228P. Phần thể axit amin này làm giảm sự trao đổi nhánh Fab in vivo của kháng

thể IgG₄ (xem Stubenrauch et al., Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)). Theo một phương án cụ thể khác, miền Fc là người. Trình tự minh họa của miền Fc của IgG₁ ở người được đưa ra trong SEQ ID NO: 149.

Sự biến đổi miền Fc thúc đẩy sự heterodime hóa.

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây bao gồm gốc gắn kết kháng nguyên khác nhau, được dung hợp với một cấu trúc hoặc cấu trúc còn lại trong hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc, như vậy hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc thông thường được bao gồm trong hai chuỗi polypeptit không giống hệt nhau. Việc đồng biểu hiện tái tổ hợp của các polypeptit này và sự dime hóa sau đó tạo ra một vài tổ hợp có thể có của hai polypeptit. Để làm tăng năng suất và độ tinh khiết của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T trong quá trình sản xuất tái tổ hợp, như vậy sẽ có lợi nếu đưa vào trong miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T việc cải biến thúc đẩy sự liên kết của các polypeptit mong muốn.

Do vậy, theo các phương án cụ thể, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây bao gồm việc cải biến thúc đẩy sự liên kết giữa của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc. Vị trí tương tác protein-protein rộng nhất giữa hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc của IgG ở người là trong miền CH3 của miền Fc. Như vậy, theo một phương án, sự biến đổi đã nêu là trong miền CH3 của miền Fc.

Theo một phương án cụ thể, sự biến đổi còn được gọi là sự biến đổi “phần phình thành phần lõm”, bao gồm sự biến đổi “phần phình” ở một trong hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc và sự biến đổi “phần lõm” ở cấu trúc còn lại trong hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc.

Công nghệ phần phình thành phần lõm được mô tả trong, ví dụ, US 5,731,168; US 7,695,936; Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) và Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). Thông thường, phương pháp này bao gồm bước đưa phần lồi (“phần phình”) ở bề mặt chung của polypeptit thứ nhất và hốc tương ứng (“phần lõm”) ở bề mặt chung của polypeptit thứ hai, sao cho phần lồi có thể được đặt trong hốc để thúc đẩy sự tạo ra heterodime và cản trở sự hình thành dime cùng loại. Phần lồi được cấu trúc bằng cách thay thế các mạch bên axit amin nhỏ từ bề mặt chung của polypeptit thứ nhất bằng mạch bên lớn hơn (ví dụ, tyrosin hoặc tryptophan). Các hốc bù có kích cỡ giống nhau hoặc tương tự với phần lồi được tạo ra trong bề mặt chung của polypeptit thứ hai bằng cách thay thế các mạch bên axit amin lớn hơn bằng các mạch bên nhỏ hơn (ví dụ, alanin hoặc threonin).

Do đó, theo một phương án cụ thể, trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có thể tích mạch bên lớn hơn, nhờ đó tạo ra phần lồi bên trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất mà được bố trí được trong hốc bên trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai, và trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc, gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có thể tích mạch bên nhỏ hơn, nhờ đó tạo ra hốc bên trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai mà trong đó phần lồi bên trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất được bố trí.

Phần lồi và hốc này có thể được tạo ra bằng cách biến đổi axit nucleic mã hóa polypeptit, ví dụ, bằng cách gây đột biến đặc hiệu vị trí, hoặc bằng cách tổng hợp peptit.

Theo một phương án cụ thể, trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc, gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc tryptophan (T366W), và trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc, gốc tyrosin ở vị trí 407 được thay thế bằng gốc valin (Y407V). Theo một phương án, ngoài ra, trong cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc, gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc serin (T366S) và gốc leuxin ở vị trí 368 được thay thế bằng gốc alanin (L368A).

Theo một phương án khác nữa, ngoài ra trong cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc, gốc serin ở vị trí 354 được thay thế bằng gốc xystein (S354C), và ngoài ra, trong cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc, gốc tyrosin ở vị trí 349 được thay thế bằng gốc xystein (Y349C). Việc đưa hai gốc xystein này vào dẫn đến việc tạo ra cầu disulfua giữa hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc, từ đó làm ổn định thêm dime (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

Theo phương án cụ thể, gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T được dung hợp (tùy ý thông qua gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với kháng nguyên tế bào đích) với cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc (bao gồm sự biến đổi “phần phình”). Không được bao bởi lý thuyết, sự dung hợp của gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T với cấu trúc siêu phân tử chứa phần phình của miền Fc sẽ (còn) làm giảm thiểu việc tạo ra các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa hai gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T (sự va chạm không gian của hai polypeptit chứa phần phình).

Theo một phương án thay thế, sự biến đổi thúc đẩy sự liên kết của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc bao gồm sự biến đổi điều tiết tác dụng điều khiển tĩnh điện, ví dụ như được mô tả trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2009/089004. Thông thường, phương pháp này bao gồm sự thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin ở bề mặt chung của hai cấu

trúc siêu phân tử của miền Fc bằng các gốc axit amin tích điện sao cho sự tạo ra homodime trở nên bất lợi về mặt tĩnh điện nhưng sự heterodime hóa lại có lợi về mặt tĩnh điện.

Sự biến đổi miền Fc loại bỏ sự gắn kết thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động

Miền Fc mang lại cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T các tính chất được động học có lợi, bao gồm thời gian bán hủy trong huyết thanh lâu mà góp phần vào việc tích tụ tốt trong mô đích và tỷ lệ phân bố máu-mô có lợi. Tuy nhiên, ở cùng thời điểm đó nó có thể dẫn đến việc hướng đích không mong muốn của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T đến tế bào biểu hiện thụ thể Fc thay vì đến tế bào mang kháng nguyên được ưu tiên. Hơn nữa, việc đồng hoạt hóa con đường truyền tín hiệu thụ thể Fc có thể dẫn đến việc giải phóng xytokin mà, kết hợp với các tính chất hoạt hóa tế bào T và thời gian bán hủy lâu của phân tử gắn kết kháng nguyên, dẫn đến việc hoạt hóa quá mức thụ thể xytokin và các tác dụng phụ nghiêm trọng khi dùng toàn thân. Việc hoạt hóa tế bào miễn dịch (mang thụ thể Fc) khác với tế bào T thậm chí có thể làm giảm hiệu quả của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T do sự phá hủy có thể có của tế bào T, ví dụ, bằng tế bào NK.

Do đó, theo các phương án cụ thể, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây biểu hiện ái lực gắn kết với thụ thể Fc giảm và/hoặc chức năng tác động giảm, so với miền Fc của IgG₁ tự nhiên. Theo một phương án như vậy, miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc này) biểu hiện ít hơn 50%, tốt hơn là ít hơn 20%, tốt hơn nữa là ít hơn 10% và tốt nhất là ít hơn 5% ái lực gắn kết với thụ thể Fc, so với miền Fc của IgG₁ tự nhiên (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc của IgG₁ tự nhiên), và/hoặc ít hơn 50%, tốt hơn là ít hơn 20%, tốt hơn nữa là ít hơn 10% và tốt nhất là ít hơn 5% chức năng tác động, so với miền Fc của IgG₁ tự nhiên (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc của IgG₁ tự nhiên). Theo một phương án, miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc này) hầu như không gắn kết với thụ thể Fc và/hoặc cảm ứng chức năng tác động. Theo một phương án cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fc γ . Theo một phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc người. Theo một phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc hoạt hóa. Theo một phương án cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fc γ người hoạt hóa, cụ thể hơn là Fc γ RIIIa, Fc γ RI hoặc Fc γ RIIa người, cụ thể nhất là Fc γ RIIIa người. Theo một phương án, chức năng tác động là một hoặc nhiều chức năng được chọn từ nhóm bao gồm CDC, ADCC, ADCP, và tiết xytokin. Theo một phương án cụ thể, chức năng tác động là ADCC. Theo một phương án, miền Fc biểu hiện ái lực gắn kết gần như tương tự với thụ thể Fc sơ sinh (FcRn), so với miền Fc của IgG₁ tự nhiên. Gắn kết gần như tương tự với FcRn đạt được khi miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc này) biểu hiện lớn hơn

khoảng 70%, đặc biệt là lớn hơn khoảng 80%, đặc biệt hơn nữa là lớn hơn khoảng 90% ái lực gắn kết của miền Fc của IgG₁ tự nhiên (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc của IgG₁ tự nhiên) với FcRn.

Theo một số phương án, miền Fc được xử lý kỹ thuật để có ái lực gắn kết với thụ thể Fc giảm và/hoặc chức năng tác động giảm, so với miền Fc không được xử lý kỹ thuật. Theo các phương án cụ thể, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm một hoặc nhiều đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động. Thông thường, một hoặc nhiều đột biến axit amin giống nhau có trong mỗi một trong hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Theo một phương án, đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc. Theo một phương án, đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc ít nhất là 2 lần, ít nhất 5 lần, hoặc ít nhất 10 lần. Theo các phương án mà có nhiều hơn một đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc, tổ hợp của các đột biến axit amin này có thể làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc ít nhất 10 lần, ít nhất 20 lần, hoặc thậm chí ít nhất 50 lần. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc được xử lý kỹ thuật biểu hiện ít hơn 20%, đặc biệt là ít hơn 10%, đặc biệt hơn là ít hơn 5% ái lực gắn kết với thụ thể Fc so với phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc không được xử lý kỹ thuật. Theo một phương án cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fc γ . Theo một số phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc ở người. Theo một số phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc hoạt hóa. Theo một phương án cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fc γ người hoạt hóa, cụ thể hơn là Fc γ RIIIa, Fc γ RI hoặc Fc γ RIIa người, cụ thể nhất là Fc γ RIIIa người. Tốt hơn là, mức gắn kết với từng thụ thể này được làm giảm. Theo một số phương án, ái lực gắn kết với thành phần bổ sung, ái lực gắn kết đặc hiệu với C1q, cũng được làm giảm. Theo một phương án, ái lực gắn kết với thụ thể Fc sơ sinh (FcRn) không được làm giảm. Gắn kết gần như tương tự với FcRn, tức là việc bảo quản ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể này, đạt được khi miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc này) biểu hiện lớn hơn khoảng 70% ái lực gắn kết của dạng không được xử lý kỹ thuật của miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm dạng không được xử lý kỹ thuật của miền Fc này) với FcRn. Miền Fc, hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm miền Fc này, có thể biểu hiện lớn hơn khoảng 80% và thậm chí lớn hơn khoảng 90% ái lực như vậy. Theo một số phương án, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được xử lý kỹ thuật để có chức năng tác động giảm, so với miền Fc không được xử lý kỹ thuật. Chức năng tác động giảm có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều chức năng sau: độ độc hại tế bào phụ thuộc vào thể bổ sung (CDC) giảm, độ độc hại tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) giảm, thực bào ở tế bào

phụ thuộc vào kháng thể (ADCP) giảm, tiết xytokin giảm, hấp thụ kháng nguyên qua trung gian phức miễn dịch bởi tế bào trình diện kháng nguyên giảm, gắn kết với tế bào NK giảm, gắn kết với đại thực bào giảm, gắn kết với tế bào đơn nhân giảm, gắn kết với tế bào nhiều dạng nhân giảm, sự chết tế bào theo chương trình cảm ứng việc truyền tín hiệu trực tiếp giảm, liên kết chéo của các kháng thể gắn kết đích giảm, sự trưởng thành tế bào đuôi gai giảm, hoặc môi tế bào T giảm. Theo một phương án, chức năng tác động giảm là một hoặc nhiều chức năng được chọn từ nhóm bao gồm CDC giảm, ADCC giảm, ADCP giảm, và tiết xytokin giảm. Theo một phương án cụ thể, chức năng tác động giảm là ADCC giảm. Theo một phương án, ADCC giảm ít hơn 20% ADCC được cảm ứng bằng miễn Fc không được xử lý kỹ thuật (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miễn Fc không được xử lý kỹ thuật).

Theo một phương án, đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của miễn Fc với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động là phần thể axit amin. Theo một phương án, miễn Fc bao gồm phần thể axit amin ở vị trí được chọn từ nhóm bao gồm E233, L234, L235, N297, P331 và P329. Theo một phương án cụ thể hơn, miễn Fc bao gồm phần thể axit amin ở vị trí được chọn từ nhóm bao gồm L234, L235 và P329. Theo một số phương án, miễn Fc bao gồm phần thể axit amin L234A và L235A. Theo một phương án như vậy, miễn Fc là miễn Fc của IgG₁, đặc biệt là miễn Fc của IgG₁ người. Theo một phương án, miễn Fc bao gồm phần thể axit amin ở vị trí P329. Theo một phương án cụ thể hơn, phần thể axit amin là P329A hoặc P329G, đặc biệt là P329G. Theo một phương án, miễn Fc bao gồm phần thể axit amin ở vị trí P329 và phần thể axit amin khác ở vị trí được chọn từ E233, L234, L235, N297 và P331. Theo một phương án cụ thể hơn, phần thể axit amin khác này là E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D hoặc P331S. Theo các phương án cụ thể, miễn Fc bao gồm phần thể axit amin ở vị trí P329, L234 và L235. Theo các phương án cụ thể hơn, miễn Fc bao gồm đột biến axit amin L234A, L235A và P329G (“P329G LALA”). Theo một phương án như vậy, miễn Fc là miễn Fc của IgG₁, đặc biệt là miễn Fc của IgG₁ người. Tổ hợp “P329G LALA” của các phần thể axit amin loại bỏ gần như hoàn toàn sự gắn kết thụ thể Fcγ của miễn Fc của IgG₁ người, như được mô tả trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2012/130831. WO 2012/130831 còn mô tả phương pháp xây dựng miễn Fc đột biến như vậy và phương pháp xác định các tính chất của nó như gắn kết thụ thể Fc hoặc chức năng tác động.

Kháng thể IgG₄ biểu hiện ái lực gắn kết với thụ thể Fc giảm và chức năng tác động giảm so với kháng thể IgG₁. Do đó, theo một số phương án, miễn Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế là miễn Fc của IgG₄, đặc biệt là miễn Fc của IgG₄ người. Theo một phương án, miễn Fc của IgG₄ bao gồm phần thể axit amin ở vị trí S228, đặc biệt là phần thể axit amin S228P. Để làm giảm thêm ái lực gắn kết của nó với thụ thể

Fc và/hoặc chức năng tác động của nó, theo một phương án, miền Fc của IgG₄ bao gồm phần thể axit amin ở vị trí L235, đặc biệt là phần thể axit amin L235E. Theo một phương án khác, miền Fc của IgG₄ bao gồm phần thể axit amin ở vị trí P329, đặc biệt là phần thể axit amin P329G. Theo một phương án cụ thể, miền Fc của IgG₄ bao gồm phần thể axit amin ở vị trí S228, L235 và P329, đặc biệt là phần thể axit amin S228P, L235E và P329G. Các đột biến miền Fc của IgG₄ này và các tính chất gắn kết thụ thể Fc γ của chúng được mô tả trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2012/130831.

Theo một phương án cụ thể, miền Fc biểu hiện ái lực gắn kết với thụ thể Fc giảm và/hoặc chức năng tác động giảm, so với miền Fc của IgG₁ tự nhiên, là miền Fc của IgG₁ người bao gồm phần thể axit amin L234A, L235A và tùy ý P329G, hoặc miền Fc của IgG₄ người bao gồm phần thể axit amin S228P, L235E và tùy ý P329G.

Theo một số phương án, việc N-glycosyl hóa của miền Fc được loại bỏ. Theo một phương án như vậy, miền Fc bao gồm đột biến axit amin ở vị trí N297, cụ thể là phần thể axit amin thay thế asparagin bằng alanin (N297A) hoặc axit aspartic (N297D).

Ngoài các miền Fc được mô tả trên đây và trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2012/130831, miền Fc có khả năng gắn kết thụ thể Fc giảm và/hoặc chức năng tác động giảm còn bao gồm các miền có sự thay thế một hoặc nhiều gốc miền Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (patent Mỹ số 6,737,056). Các đột biến Fc này bao gồm đột biến Fc có sự thay thế ở hai hoặc nhiều vị trí axit amin 265, 269, 270, 297 và 327, bao gồm đột biến Fc còn gọi là “DANA” có sự thay thế gốc 265 và 297 bằng alanin (patent Mỹ số 7,332,581).

Miền Fc đột biến có thể được xây dựng bằng cách làm khuyết, thay thế, xen vào hoặc cải biến axit amin sử dụng phương pháp di truyền hoặc phương pháp hóa học đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Phương pháp di truyền có thể bao gồm đột biến đặc hiệu vị trí của trình tự ADN mã hóa, PCR, tổng hợp gen, và phương pháp tương tự. Các thay đổi nucleotit chính xác có thể được xác minh bằng cách, ví dụ, bằng tạo trình tự.

Gắn kết với thụ thể Fc có thể dễ dàng được xác định bằng, ví dụ, ELISA, hoặc cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) sử dụng trang bị tiêu chuẩn như thiết bị BIAcore (GE Healthcare), và thụ thể Fc như có thể thu được bằng cách biểu hiện tái tổ hợp. Thử nghiệm gắn kết thích hợp như vậy được mô tả ở đây. Theo một cách khác, ái lực gắn kết của miền Fc hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào bao gồm miền Fc đối với thụ thể Fc có thể được đánh giá bằng cách sử dụng dòng tế bào đã biết để biểu hiện thụ thể Fc cụ thể, như tế bào NK người biểu hiện thụ thể Fc γ III.

Chức năng tác động của miền Fc, hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc, có thể được đo bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thử nghiệm thích hợp để đo ADCC được mô tả ở đây. Các ví dụ khác về thử nghiệm *in vitro* để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử đáng quan tâm được mô tả trong patent Mỹ số. 5,500,362; Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) và Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); patent Mỹ số 5,821,337; Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). Theo một cách khác, phương pháp thử nghiệm không hoạt tính phóng xạ có thể được sử dụng (xem, ví dụ, thử nghiệm độc hại tế bào không hoạt tính phóng xạ ACTITM đối với kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); và thử nghiệm độc hại tế bào không hoạt tính phóng xạ CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Tế bào tác động hữu ích cho thử nghiệm này bao gồm tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và tế bào diệt tự nhiên (NK). Theo một cách khác, hoặc ngoài ra, hoạt tính ADCC của phân tử đáng quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, ví dụ, trong mô hình động vật như mô hình được bộc lộ trong Clynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

Theo một số phương án, mức gắn kết của miền Fc với thành phần bổ sung, cụ thể với C1q, được làm giảm. Do đó, theo một số phương án trong đó miền Fc được xử lý kỹ thuật để có chức năng tác động giảm, chức năng tác động giảm này bao gồm CDC giảm. Thử nghiệm gắn kết C1q có thể được thực hiện để xác định liệu phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể gắn kết C1q không và do đó có hoạt tính CDC. Xem ví dụ, ELISA gắn kết C1q và C3c trong WO 2006/029879 và WO 2005/100402. Để đánh giá sự hoạt hóa bổ sung, thử nghiệm CDC có thể được thực hiện (xem, ví dụ, Gazzano-Santoro et al., J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg et al., Blood 101, 1045-1052 (2003); và Cragg and Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

Gốc gắn kết kháng nguyên

Phân tử gắn kết kháng nguyên được bộc lộ ở đây là phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép, tức là, nó bao gồm ít nhất hai gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với hai chất xác định kháng nguyên khác biệt. Theo bộc lộ này, các gốc gắn kết kháng nguyên là phân tử Fab (tức là, miền gắn kết kháng nguyên gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, mỗi chuỗi chứa vùng biến đổi và vùng không biến đổi). Theo một phương án, phân tử Fab đã nêu là ở người. Theo phương án khác, phân tử Fab đã nêu được người hóa. Theo phương án khác nữa, các phân tử Fab đã nêu bao gồm các vùng không đổi chuỗi nặng và vùng không đổi chuỗi nhẹ ở người.

Ít nhất một trong số các gốc gắn kết kháng nguyên là phân tử Fab mạch đơn hoặc phân tử Fab lai chéo. Sự biến đổi này ngăn ngừa sự ghép cặp sai của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ từ các phân tử Fab khác nhau, nhờ đó làm tăng cường hiệu suất và độ tinh khiết của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây trong quá trình sản xuất tái tổ hợp. Cụ thể, phân tử Fab mạch đơn hữu ích cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây, đầu tận C của chuỗi nhẹ Fab được nối với đầu tận N của chuỗi nặng Fab bằng liên kết peptit. Liên kết peptit cho phép sắp xếp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab để tạo thành gốc gắn kết kháng nguyên chức năng. Liên kết peptit thích hợp để nối chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab bao gồm, ví dụ, $(G_4S)_6$ -GG (SEQ ID NO: 152) hoặc $(SG_3)_2$ -(SEG_3)₄-(SG_3)-SG (SEQ ID NO: 153). Trong phân tử Fab lai chéo cụ thể hữu ích cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây, các vùng không đổi của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được chuyển đổi. Theo phân tử Fab lai chéo khác hữu ích cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây, các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được chuyển đổi.

Theo phương án cụ thể được bộc lộ ở đây, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có khả năng gắn kết đồng thời với kháng nguyên tế bào đích, cụ thể là kháng nguyên tế bào khối u, và với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có khả năng gắn kết chéo tế bào T và tế bào đích bằng cách kích thích gắn kết đồng thời với kháng nguyên tế bào đích và với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T. Theo phương án cụ thể hơn nữa, việc gắn kết đồng thời này làm phân giải tế bào đích, cụ thể là tế bào khối u. Theo một phương án, việc gắn kết đồng thời này làm kích hoạt tế bào T. Theo các phương án khác, việc gắn kết đồng thời này tạo ra đáp ứng tế bào của tế bào lympho T, cụ thể là tế bào lympho T gây độc tế bào, được chọn từ nhóm gồm: sự tăng sinh, sự biệt hóa, sự tiết xytokin, giải phóng phân tử tác động độc tố tế bào, hoạt tính độc tố tế bào, và sự biểu hiện của gen đánh dấu hoạt hóa. Theo một phương án, việc gắn kết của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T mà không gắn kết đồng thời với kháng nguyên tế bào đích không tạo ra sự hoạt hóa tế bào T.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có khả năng điều khiển lại hoạt tính độc tố tế bào của tế bào T với tế bào đích. Theo phương án cụ thể, sự điều khiển lại độc lập với sự trình bày kháng nguyên peptit do MHC gây ra bởi tế bào đích và/hoặc tính đặc hiệu của tế bào T.

Cụ thể là, tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án được bộc lộ này là tế bào T gây độc tế bào. Theo một số phương án, tế bào T là tế bào T dương tính với CD4 hoặc dương tính với CD8, cụ thể là tế bào T dương tính với CD8.

Gốc gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây chứa ít nhất một gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T (trong bản mô tả này còn được gọi là “gốc gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T”). Theo phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa không quá một gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T tạo ra liên kết hóa trị một với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T. Gốc gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T hoặc có thể là phân tử Fab thông thường hoặc phân tử Fab được biến đổi, tức là, mạch đơn hoặc phân tử Fab lai chéo. Theo các phương án trong đó có trên một gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích được bao gồm trong phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T tốt hơn nếu là phân tử Fab được biến đổi.

Theo phương án cụ thể, kháng nguyên hoạt hóa tế bào T là CD3, cụ thể là CD3 ở người (SEQ ID NO: 265) hoặc CD3 ở khỉ (SEQ ID NO: 266), đặc biệt nhất CD3 ở người. Theo phương án cụ thể, gốc gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T là phản ứng chéo (tức là, gắn kết đặc hiệu với) CD3 ở người và khỉ. Theo một số phương án, kháng nguyên hoạt hóa tế bào T là cấu trúc siêu phân tử epsilon của CD3.

Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T có thể cạnh tranh với H2C kháng thể đơn dòng (được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO2008/119567) đối với liên kết epitop của CD3. Theo một phương án khác nữa, gốc gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T có thể cạnh tranh với kháng thể đơn dòng V9 (được mô tả trong Rodrigues et al., Int J Cancer Suppl 7, 45-50 (1992) và patent Mỹ số 6,054,297) đối với liên kết epitop của CD3. Theo phương án khác nữa, gốc gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T có thể cạnh tranh với kháng thể đơn dòng FN18 (được bộc lộ trong Nooij et al., Eur J Immunol 19, 981-984 (1986)) đối với liên kết epitop của CD3. Theo phương án cụ thể, gốc gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T có thể cạnh tranh với kháng thể đơn dòng SP34 (được bộc lộ trong Pessano et al., EMBO J 4, 337-340 (1985)) đối với liên kết epitop của CD3. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T gắn kết với cùng epitop của CD3

như kháng thể đơn dòng SP34. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T chứa CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 163, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 165, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 167, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 171, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 173, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 175. Theo phương án khác, gốc gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 169 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 177, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng.

Theo phương án cụ thể, gốc gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T chứa CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 249, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 251, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 253, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 257, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 259, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 261. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T có thể cạnh tranh đối với liên kết epitop của CD3 với gốc gắn kết kháng nguyên chứa CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 249, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 251, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 253, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 257, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 259, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 261. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T gắn kết với cùng epitop của CD3 làm gốc gắn kết kháng nguyên chứa CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 249, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 251, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 253, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 257, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 259, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 261. Theo phương án khác, gốc gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 255 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 263, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T có thể cạnh tranh đối với liên kết epitop của CD3 với gốc gắn kết kháng nguyên chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 255 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 263. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T gắn kết với cùng epitop của CD3 làm gốc gắn kết kháng nguyên chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 255 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 263. Theo phương án khác, gốc gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T chứa biến thể được người hóa

của trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 255 và biến thể được người hóa của trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 263. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T chứa CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 249, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 251, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 253, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 257, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 259, CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 261, và các trình tự khung của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở người.

Gốc gắn kết kháng nguyên tế bào đích

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây chứa ít nhất một gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với kháng nguyên tế bào đích (trong bản mô tả này còn được gọi là “gốc gắn kết kháng nguyên tế bào đích”). Theo các phương án nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa hai gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với kháng nguyên tế bào đích. Theo phương án cụ thể này, mỗi gốc trong số các gốc gắn kết kháng nguyên này gắn kết đặc hiệu với cùng chất xác định kháng nguyên. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa phân tử globulin miễn dịch có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa không quá hai gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với kháng nguyên tế bào đích.

Gốc gắn kết kháng nguyên tế bào đích thường là phân tử Fab mà gắn kết với chất xác định kháng nguyên cụ thể và có khả năng hướng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T đến vị trí đích, ví dụ đến loại đặc hiệu của tế bào khối u mà mang chất xác định kháng nguyên.

Theo các phương án nhất định, gốc gắn kết kháng nguyên tế bào đích được hướng đến kháng nguyên có liên quan đến tình trạng bệnh lý, như kháng nguyên có mặt trên tế bào khối u hoặc trên tế bào nhiễm virus. Các kháng nguyên thích hợp các kháng nguyên bề mặt tế bào, ví dụ, nhưng không bị giới hạn ở, các thụ thể bề mặt tế bào. Theo các phương án cụ thể, kháng nguyên là kháng nguyên ở người. Theo phương án cụ thể, kháng nguyên tế bào đích được chọn từ nhóm gồm protein hoạt hóa nguyên bào sợi (Fibroblast Activation Protein - FAP), chondroitin sulfat proteoglycan liên quan đến khối u các tính (Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan - MCSP), thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR), kháng nguyên ung thư phổi (CEA), CD19, CD20 và CD33.

Theo các phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa ít nhất một gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với chondroitin sulfat proteoglycan liên quan đến khối u các tính (MCSP). Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa ít nhất một, thường là hai hoặc nhiều gốc gắn kết kháng nguyên mà có thể cạnh tranh với kháng thể đơn dòng LC007 (xem SEQ ID NO 75 và 83, và đơn patent cấp patent châu Âu số EP 2748195) đối với gắn kết với epitop của MCSP. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với MCSP chứa CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 69, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 71, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 73, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 77, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 79, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 81. Theo phương án khác, gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với MCSP chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 75 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 83, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo các phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa ít nhất một, thường là hai hoặc nhiều gốc gắn kết kháng nguyên mà có thể cạnh tranh với kháng thể đơn dòng M4-3 ML2 (xem SEQ ID NO 239 và 247, và công bố đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số EP 2748195) để gắn kết với epitop của MCSP. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với MCSP gắn kết với cùng epitop của MCSP làm kháng thể đơn dòng M4-3 ML2. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với MCSP chứa CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 233, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 235, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 237, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 241, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 243, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 245. Theo phương án khác, gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với MCSP chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%, cụ thể là khoảng 98%, 99% hoặc 100%, với SEQ ID NO: 239 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%, cụ thể là khoảng 98%, 99% hoặc 100%, với SEQ ID NO: 247, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với MCSP chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của biến thể ái lực trưởng thành của kháng thể đơn dòng M4-3 ML2. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với MCSP chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 239 có một, hai, ba, bốn, năm, sáu hoặc bảy,

cụ thể là hai, ba, bốn hoặc năm phần thể axit amin; và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 247 có một, hai, ba, bốn, năm, sáu hoặc bảy, cụ thể là hai, ba, bốn hoặc năm phần thể axit amin. Gốc axit amin bất kỳ trong các trình tự vùng biến đổi có thể được thay thế bằng axit amin khác nhau, bao gồm gốc axit amin trong các vùng CDR, với điều kiện là gắn kết với MCSP, cụ thể là MCSP ở người, được bảo toàn. Các biến thể được ưu tiên là các biến thể có ái lực liên kết đối với MCSP ít nhất bằng (hoặc mạnh hơn) với ái lực gắn kết của gốc gắn kết kháng nguyên chứa các trình tự vùng biến đổi không được thế.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 1, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 3 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 5, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 7, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 9 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 11, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo phương án khác nữa, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 13, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 15 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 5, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo phương án khác nữa, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 17, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 19 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 5, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 21, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 23 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 5, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo phương án khác nữa, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 25, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 27 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 5, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 29, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 31, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 33, và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 5, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo phương án khác phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 29, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 3, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 33, và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 5, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo phương án khác phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ

ID NO: 35, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 3, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 37, và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 5, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 39, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 3, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 41, và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 5, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo phương án khác nữa, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 29, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 3, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 5 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 179, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 5, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 29, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 33 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 181, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 5, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 23, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 183 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 185, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 5, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 23, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 183 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 187, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 33, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 189, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 191 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 193, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 183, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 189, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 193 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 195, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 189, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 193, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 199 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 201, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 5, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 23, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 215 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 217, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình

tự polypeptit của SEQ ID NO: 5, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 23, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 215 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 219, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng.

Theo phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit được mã hóa bởi trình tự polynucleotit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 234, SEQ ID NO: 236, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 218 và SEQ ID NO: 220.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa ít nhất một gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR). Theo phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa ít nhất một, thường là hai hoặc nhiều gốc gắn kết kháng nguyên mà có thể cạnh tranh với kháng thể đơn dòng GA201 để gắn kết với epitop của EGFR. Xem công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2006/082515. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với EGFR chứa CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 85, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 87, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 89, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 93, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 95, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 97. Theo phương án khác, gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với EGFR chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 91 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 99, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng.

Theo phương án khác nữa, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 43, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 45 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 47, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 49, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 51 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 11, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo phương án khác nữa, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 53, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 45 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 47, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng.

Theo phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit được mã hóa bởi trình tự polynucleotit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 và SEQ ID NO: 12.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa ít nhất một gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với protein hoạt hóa nguyên bào sợi - Fibroblast Activation Protein (FAP). Theo phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa ít nhất một, thường là hai hoặc nhiều gốc gắn kết kháng nguyên mà có thể cạnh tranh với kháng thể đơn dòng 3F2 để gắn kết với epitop của FAP. Xem công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2012/020006. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với FAP chứa CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 101, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 103, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 105, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 109, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 111, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 113. Theo phương án khác, gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với FAP chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 107 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 115, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng.

Theo phương án khác nữa, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 55, trình tự polypeptit của SEQ ID NO:

51 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 11, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 57, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 59 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 61, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng.

Theo phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit được mã hóa bởi trình tự polynucleotit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 52 và SEQ ID NO: 12.

Theo các phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa ít nhất một gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với kháng nguyên ung thư phổi (CEA). Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa ít nhất một, thường là hai hoặc nhiều gốc gắn kết kháng nguyên mà có thể cạnh tranh với kháng thể đơn dòng BW431/26 (được bộc lộ trong patent châu Âu số EP 160 897, và Bosslet et al., Int J Cancer 36, 75-84 (1985)) để gắn kết với epitop của CEA. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa ít nhất một, thường là hai hoặc nhiều gốc gắn kết kháng nguyên mà có thể cạnh tranh với kháng thể đơn dòng CH1A1A (xem SEQ ID NO 123 và 131) để gắn kết với epitop của CEA. Xem công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2011/023787. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với CEA gắn kết với cùng epitop của CEA làm kháng thể đơn dòng CH1A1A. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với CEA chứa CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 117, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 119, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 121, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 125, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 127, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 129. Theo phương án khác, gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với CEA chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%, cụ thể là khoảng 98%, 99% hoặc 100%, với SEQ ID NO: 123 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%, cụ thể là khoảng 98%, 99% hoặc 100%, với SEQ ID NO: 131, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với CEA chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng

của biến thể ái lực trưởng thành của kháng thể đơn dòng CH1A1A. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với CEA chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 123 với một, hai, ba, bốn, năm, sáu hoặc bảy, cụ thể là hai, ba, bốn hoặc năm, phần thể axit amin; và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 131 với một, hai, ba, bốn, năm, sáu hoặc bảy, cụ thể là hai, ba, bốn hoặc năm, phần thể axit amin. Gốc axit amin bất kỳ trong các trình tự vùng biến đổi có thể được thay thế bằng axit amin khác nhau, bao gồm gốc axit amin trong các vùng CDR, với điều kiện là gắn kết với CEA, cụ thể là CEA ở người, được bảo toàn. Các biến thể được ưu tiên là các biến thể có ái lực liên kết for CEA ít nhất bằng (hoặc mạnh hơn) đối với ái lực gắn kết của gốc gắn kết kháng nguyên chứa các trình tự vùng biến đổi không được thế.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 63, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 65, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 67 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 33, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 65, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 67, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 183 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 197, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 183, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 203, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 205 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 207, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 183, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 209, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 211 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 213, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng.

Theo phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit được mã hóa bởi trình tự polynucleotit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 210, SEQ ID NO: 212 và SEQ ID NO: 214.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa ít nhất một gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với CD33. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với CD33 chứa CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 133, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 135, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 137, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 141, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 143, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 145. Theo phương án khác, gốc gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với CD33 chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 139 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 147, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 33, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 213, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 221 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 223, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 33, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 221, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 223 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 225, hoặc các biến thể của chúng mà giữ được chức năng.

Theo phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit được mã hóa bởi trình tự polynucleotit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 214, SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 224 và SEQ ID NO: 226.

Polynucleotit

Sáng chế còn đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T như được nêu trong bản mô tả này hoặc mảnh của chúng.

Polynucleotit được bộc lộ ở đây gồm polynucleotit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự được nêu trong SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86,

88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262 và 264, bao gồm các mảnh chức năng hoặc các biến thể của chúng.

Polynucleotit mã hóa cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây có thể được biểu hiện dưới dạng là một polynucleotit mà mã hóa toàn bộ phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T hoặc dưới dạng nhiều polynucleotit (ví dụ, hai hoặc nhiều) mà được đồng biểu hiện. Các polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit mà được đồng biểu hiện có thể gắn kết qua, ví dụ, các liên kết disulfua hoặc các cách khác để tạo thành phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chức năng. Ví dụ, một phần chuỗi nhẹ của gốc gắn kết kháng nguyên có thể là được mã hóa bởi polynucleotit riêng từ một phần của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa một phần chuỗi nặng của gốc gắn kết kháng nguyên, cấu trúc siêu phân tử của miền Fc và tùy chọn (một phần của) gốc gắn kết kháng nguyên khác nữa. Khi được đồng biểu hiện, các polypeptit chuỗi nặng sẽ gắn kết với các polypeptit chuỗi nhẹ để tạo thành gốc gắn kết kháng nguyên. Trong một ví dụ khác, một phần của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa một trong số hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc và tùy chọn (một phần của) một hoặc nhiều gốc gắn kết kháng nguyên có thể được mã hóa bởi polynucleotit riêng từ một phần của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa một trong số hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc và tùy chọn (một phần của) gốc gắn kết kháng nguyên. Khi được đồng biểu hiện, các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc sẽ liên kết để tạo thành miền Fc.

Theo các phương án nhất định, polynucleotit được phân lập được bộc lộ ở đây mã hóa mảnh của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai, và miền Fc bao gồm hai cấu trúc siêu phân tử, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab mạch đơn. Theo một phương án, polynucleotit được phân lập được bộc lộ ở đây mã hóa gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Theo phương án cụ thể hơn, polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit trong đó phân tử Fab mạch đơn cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Theo phương án khác, polynucleotit được phân lập được bộc lộ ở đây mã hóa chuỗi nặng của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và cấu

trúc siêu phân tử của miền Fc. Theo phương án cụ thể hơn, polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy có cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Theo phương án khác nữa, polynucleotit được phân lập được bộc lộ ở dạng mã hóa gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất, chuỗi nặng của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Theo phương án cụ thể hơn, polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit trong đó phân tử Fab mạch đơn cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với chuỗi nặng Fab, mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc.

Theo các phương án nhất định, polynucleotit được phân lập được bộc lộ ở đây mã hóa mảnh của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai, và miền Fc bao gồm hai cấu trúc siêu phân tử, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo. Theo một phương án, polynucleotit được phân lập được bộc lộ ở đây mã hóa chuỗi nặng của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Theo một phương án cụ thể hơn, polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi chuỗi nặng Fab, mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Theo phương án cụ thể khác nữa, polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi của chuỗi nhẹ Fab, mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Theo phương án khác, polynucleotit được phân lập được bộc lộ ở đây mã hóa chuỗi nặng của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Theo phương án cụ thể hơn, polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Theo phương án khác nữa, polynucleotit được phân lập được bộc lộ ở đây mã hóa chuỗi nặng của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất, chuỗi nặng của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Theo phương án cụ thể hơn, polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi chuỗi nặng Fab, mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với chuỗi nặng Fab, mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Theo phương án cụ thể khác, polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi của chuỗi nhẹ Fab,

mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với chuỗi nặng Fab, mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Theo phương án cụ thể khác nữa, polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab, mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi chuỗi nặng Fab, mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Theo một phương án cụ thể khác nữa, polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng biến đổi của chuỗi nặng Fab, mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi của chuỗi nhẹ Fab, mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc.

Theo các phương án khác, polynucleotit được phân lập được bộc lộ ở đây mã hóa chuỗi nặng của gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba và cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Theo phương án cụ thể hơn, polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc.

Theo các phương án khác, polynucleotit được phân lập được bộc lộ ở đây mã hóa chuỗi nhẹ của gốc gắn kết kháng nguyên. Theo một số phương án, polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi chuỗi nặng Fab. Theo các phương án khác, polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit, trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi của chuỗi nhẹ Fab. Theo các phương án khác nữa, polynucleotit được phân lập được bộc lộ ở đây mã hóa chuỗi nhẹ của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và chuỗi nhẹ của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai. Theo phương án cụ thể hơn, polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi của chuỗi nhẹ Fab, mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với chuỗi nhẹ Fab. Theo phương án cụ thể, khác polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit trong đó chuỗi nhẹ Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng biến đổi của chuỗi nặng Fab, mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi của chuỗi nhẹ Fab. Theo phương án cụ thể khác nữa, polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi chuỗi nặng Fab, mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với chuỗi nhẹ Fab. Theo phương án cụ thể khác nữa, polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit trong

đó chuỗi nhẹ Fab cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab, mà theo thứ tự cùng chung liên kết peptit tận cùng carboxy với vùng không đổi chuỗi nặng Fab.

Theo phương án khác nữa, phần bộc lộ của sáng chế hướng đến polynucleotit được phân lập mã hóa cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây hoặc mảnh của chúng, trong đó polynucleotit chứa trình tự mà mã hóa trình tự vùng biến đổi bất kỳ như được thể hiện trên SEQ ID NO 75, 83, 91, 99, 107, 115, 123, 131, 139, 147, 169, 177, 239, 247, 255 và 263. Theo phương án khác, phần bộc lộ của sáng chế hướng đến polynucleotit được phân lập mã hóa cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit chứa trình tự mà mã hóa trình tự polypeptit như được thể hiện trên SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229 và 231. Theo phương án khác, phần bộc lộ của sáng chế hướng đến polynucleotit được phân lập mã hóa cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây hoặc mảnh của chúng, trong đó polynucleotit chứa trình tự mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262 hoặc 264. Theo phương án khác nữa, phần bộc lộ của sáng chế hướng đến polynucleotit được phân lập mã hóa cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây hoặc mảnh của chúng, trong đó polynucleotit chứa trình tự axit nucleic được thể hiện trong SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260,

262 hoặc 264. Theo phương án khác, phần bộc lộ của sáng chế hướng đến polynucleotit được phân lập mã hóa cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit chứa trình tự mà mã hóa trình tự vùng biến đổi bất kỳ mà có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự axit amin trong SEQ ID NO 75, 83, 91, 99, 107, 115, 123, 131, 139, 147, 169, 177, 239, 247, 255 hoặc 263. Theo phương án khác, phần bộc lộ của sáng chế hướng đến polynucleotit được phân lập mã hóa cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T hoặc mảnh của chúng, trong đó polynucleotit chứa trình tự mà mã hóa trình tự polypeptit mà mã hóa có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự axit amin trong SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229 hoặc 231. Phần bộc lộ của sáng chế bao gồm polynucleotit được phân lập mã hóa cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây hoặc mảnh của chúng, trong đó polynucleotit chứa trình tự mà mã hóa trình tự vùng biến đổi của SEQ ID NO 75, 83, 91, 99, 107, 115, 123, 131, 139, 147, 169, 177, 239, 247, 255 hoặc 263 với phần thể axit amin bảo toàn. Sáng chế còn bao gồm polynucleotit được phân lập mã hóa cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây hoặc mảnh của chúng, trong đó polynucleotit chứa trình tự mà mã hóa trình tự polypeptit của SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229 hoặc 231 với phần thể axit amin bảo toàn.

Theo các phương án nhất định, polynucleotit hoặc axit nucleic là ADN. Theo các phương án khác, polynucleotit được bộc lộ ở đây là ARN, ví dụ, dưới dạng ARN thông tin (mARN). ARN được bộc lộ ở đây có thể là dải đơn hoặc dải kép.

Các phương pháp tái tổ hợp

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây có thể thu được, ví dụ, bằng cách tổng hợp peptit ở trạng thái rắn (ví dụ tổng hợp pha rắn Merrifield) hoặc sản phẩm tái tổ hợp. Đối với sản phẩm tái tổ hợp, một hoặc nhiều polynucleotit mã hóa cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (mảnh), ví dụ, như được nêu trên, được phân lập và được cài xen vào trong một hoặc nhiều vector để tách dòng thêm và/hoặc biểu hiện trong tế bào chủ. Polynucleotit này có thể được

phân lập một cách dễ dàng và được tạo trình tự sử dụng các quy trình thông thường. Theo một phương án, vectơ, tốt hơn nếu là vectơ biểu hiện, chứa một hoặc nhiều của polynucleotit được bộc lộ ở đây được đề xuất. Các phương pháp mà đã được người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật biết rõ có thể được sử dụng để cấu trúc vectơ biểu hiện chứa trình tự mã hóa của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (mảnh) cùng với các tín hiệu không chế sự phiên mã/sự dịch mã thích hợp. Các phương pháp này bao gồm các kỹ thuật tái tổ hợp ADN *in vitro*, các kỹ thuật tổng hợp và tái tổ hợp *in vivo*/ tái tổ hợp di truyền. Xem, ví dụ, các kỹ thuật được bộc lộ trong tài liệu: Maniatis et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); và Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989). Vectơ biểu hiện có thể là một phần của plasmid, virut, hoặc có thể là mảnh axit nucleic. Vectơ biểu hiện bao gồm casset biểu hiện mà polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (mảnh) (tức là, vùng mã hóa) được tách dòng liên kết có điều khiển với gen khởi đầu và/hoặc với các thành phần kiểm soát sự phiên mã hoặc sự dịch mã khác. Trong bản mô tả này, "vùng mã hóa" là một phần của axit nucleic mà chứa các codon được dịch mã thành các axit amin. Mặc dù "codon kết thúc" (TAG, TGA, hoặc TAA) không được dịch mã thành axit amin, nó có thể được xem là một phần của vùng mã hóa, nếu có mặt, mà trình tự bên bất kỳ, ví dụ các gen khởi đầu, các vị trí liên kết ribosom, gen kết thúc phiên mã, các intron, các vùng chưa được dịch mã 5' và 3', và vùng tương tự, không phải một phần của vùng mã hóa. Hai hoặc nhiều vùng mã hóa có thể có mặt trong cấu trúc polynucleotit đơn, ví dụ trên vectơ đơn, hoặc trong các cấu trúc polynucleotit riêng, ví dụ trên vectơ riêng (khác nhau). Ngoài ra, vectơ bất kỳ có thể chứa vùng mã hóa đơn, hoặc có thể bao gồm hai hoặc nhiều vùng mã hóa, ví dụ vectơ được bộc lộ ở đây có thể mã hóa một hoặc nhiều polypeptit, mà được tách sau hoặc đồng dịch mã thành các protein cuối cùng thông qua sự phân tách protein phân giải. Ngoài ra, vectơ, polynucleotit, hoặc axit nucleic được bộc lộ ở đây có thể mã hóa các vùng mã hóa dị loại, được dung hợp hoặc không được dung hợp với polynucleotit mã hóa cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (mảnh) được bộc lộ ở đây, hoặc biến thể hoặc dẫn xuất của chúng. Các vùng mã hóa dị loại bao gồm mà không giới hạn ở các thành phần hoặc các môtip được biệt hóa, như peptit tín hiệu bài tiết hoặc miền chức năng dị loại. Sự liên kết có thể điều khiển được là khi vùng mã hóa cho sản phẩm gen, ví dụ polypeptit, là có liên quan đến một hoặc nhiều trình tự điều tiết theo kiểu sao cho thay thế sự biểu hiện của sản phẩm gen dưới sự ảnh hưởng hoặc không chế của (các) trình tự điều tiết. Hai mảnh ADN (như vùng mã hóa polypeptit và gen khởi đầu đi kèm với nó) là "được liên kết có điều khiển"

nếu sự kích thích của chức năng gen khởi đầu tạo ra sự phiên mã của ARN thông tin mã hóa cho sản phẩm gen mong muốn và nếu bản chất của liên kết giữa hai mảnh ADN không ảnh hưởng đến khả năng của trình tự điều tiết biểu hiện để hướng sự biểu hiện của sản phẩm gen hoặc ảnh hưởng đến khả năng của khuôn mẫu ADN được phiên mã. Như vậy, vùng gen khởi đầu sẽ liên kết có điều khiển với axit nucleic mã hóa polypeptit nếu gen khởi đầu có khả năng tác động đến sự phiên mã của axit nucleic đó. Gen khởi đầu có thể là gen khởi đầu đặc hiệu tế bào mà hướng sự phiên mã chủ yếu của ADN chỉ trong các tế bào được xác định trước. Các thành phần kiểm soát sự phiên mã khác, bên cạnh gen khởi đầu, ví dụ các tác nhân làm tăng cường, các gen điều khiển, các gen kìm hãm, và tín hiệu kết thúc sự phiên mã, có thể liên kết có điều khiển với polynucleotit để hướng sự phiên mã đặc hiệu tế bào. Các gen khởi đầu thích hợp và các vùng kiểm soát sự phiên mã được bộc lộ trong bản mô tả này. Một loạt vùng kiểm soát dịch mã được biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Các vùng này bao gồm, không giới hạn, các vùng kiểm soát phiên mã, mà chức năng hoạt động trong các tế bào động vật có xương sống, như, nhưng không bị giới hạn ở, gen khởi đầu và các đoạn gen tăng cường từ các virus cự bào (ví dụ gen khởi đầu sớm gần nhất, kết hợp với intron-A), simian virus 40 (ví dụ gen khởi đầu sớm), và các retrovirus (như, ví dụ virus sarcom Rous). Các vùng kiểm soát sự phiên mã bao gồm các vùng thu được từ các gen động vật có xương sống như actin, protein sốc nhiệt, hormone phát triển ở bò và α -globin ở thỏ, cũng như các trình tự khác có khả năng khống chế sự biểu hiện gen trong các tế bào có nhân điển hình. Các vùng kiểm soát phiên mã thích hợp khác bao gồm gen khởi đầu đặc hiệu ở mô và các tác nhân làm tăng cường cũng như các gen khởi đầu cảm ứng (ví dụ các tetracyclin kích thích các gen khởi đầu). Tương tự, một loạt thành phần kiểm soát dịch mã được người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật biết. Các thành phần này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các vị trí liên kết ribosom, sự bắt đầu dịch mã và các codon kết thúc, và các thành phần thu được từ các hệ virus (cụ thể là điếm vào ribosom bên trong, hoặc IRES, còn được gọi là trình tự CITE). Caxet biểu hiện này cũng có thể bao gồm các dấu hiệu khác như nguồn gốc phiên bản, và/hoặc các thành phần tích hợp nhiễm sắc thể như các đoạn lặp đầu tận dài của retrovirus (các LTR), hoặc các đoạn lặp tận cùng được đảo ngược (các ITR) của adenovirus có liên quan (AAV).

Các vùng mã hóa polynucleotit và axit nucleic được bộc lộ ở đây có thể có liên quan đến các vùng mã hóa khác mà mã hóa các peptit tiết hoặc tín hiệu, mà hướng sự bài tiết của polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit được bộc lộ ở đây. Ví dụ, nếu sự bài tiết của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được mong muốn, ADN mã hóa cho

trình tự tín hiệu có thể được đặt ở luồng phía trên của axit nucleic mã hóa cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây hoặc mảnh của chúng. Theo giả thiết tín hiệu, các protein được tiết bởi các tế bào động vật có vú có peptit tín hiệu hoặc trình tự đoạn dẫn tiết mà bị phân cắt từ protein trưởng thành ngay khi xuất khỏi chuỗi protein phát triển qua lưới nội bào tương thô đã được bắt đầu. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật cho rằng các polypeptit được tiết bởi tế bào động vật có xương sống nhìn chung có peptit tín hiệu được dung hợp với đầu tận N của polypeptit, mà bị phân cắt từ polypeptit được dịch mã để sản xuất dạng được bài tiết hoặc “trưởng thành” của polypeptit. Theo các phương án nhất định, peptit tín hiệu tự nhiên, ví dụ peptit tín hiệu chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch được sử dụng, hoặc dẫn xuất chức năng của trình tự đó mà giữ được khả năng đề hướng sự bài tiết của polypeptit mà liên quan có điều khiển được bằng polypeptit đó. Theo cách khác, peptit tín hiệu dị loại ở động vật có vú, hoặc dẫn xuất chức năng của chúng, có thể được sử dụng. Ví dụ, trình tự dẫn kiểu đại có thể được thể bằng trình tự dẫn của chất hoạt hóa plasminogen ở mô người (TPA) hoặc β -glucuronidaza ở chuột. Các trình tự axit amin minh họa và polynucleotit của các peptit tín hiệu tiết được đưa ra trong các SEQ ID NO 154-162.

ADN mã hóa trình tự protein ngắn mà có thể được sử dụng để tạo điều kiện thuận lợi cho việc tinh chế sau đó (ví dụ đuôi histidin) hoặc trợ giúp trong việc gắn nhãn phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được bao gồm trong hoặc ở cuối của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (mảnh) mã hóa cho polynucleotit.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa một hoặc nhiều polynucleotit. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa một hoặc nhiều vector. Polynucleotit và vector có thể hợp nhất dấu hiệu bất kỳ trong số các dấu hiệu, riêng lẻ hoặc kết hợp, được mô tả trong bản mô tả lần lượt liên quan đến polynucleotit và vector. Theo một phương án như vậy, tế bào chủ chứa (ví dụ đã được biến nạp hoặc đã được chuyển nhiễm với) vector chứa polynucleotit mà mã hóa (một phần của) phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “tế bào chủ” chỉ loại hệ tế bào bất kỳ mà có thể được thiết kế di truyền để tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây hoặc các mảnh của chúng. Tế bào chủ thích hợp để sao chép và để hỗ trợ sự biểu hiện của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T là đã được biết rõ trong lĩnh vực. Tế bào này có thể được chuyển nhiễm hoặc được biến nạp thích hợp bằng vector biểu hiện cụ thể và lượng lớn của vector có

chứa tế bào có thể được phát triển để gieo các chất lên men quy mô lớn để thu được lượng đủ của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cho các ứng dụng lâm sàng. Tế bào chủ thích hợp bao gồm các vi sinh vật không nhân, như *E. coli*, hoặc các tế bào có nhân điển hình khác nhau, như tế bào trứng chuột đồng Trung Hoa (CHO), tế bào côn trùng, hoặc tế bào tương tự. Ví dụ, các polypeptit có thể được tạo ra ở vi khuẩn cụ thể là khi sự glycosyl hóa là không cần. Sau khi biểu hiện, polypeptit có thể được phân lập từ thuốc nhuộm tế bào vi khuẩn trong phân đoạn hoà tan và có thể được tinh chế thêm. Ngoài các sinh vật chưa có nhân điển hình, các vi sinh vật có nhân điển hình như nấm sợi hoặc nấm men là các vật chủ tách dòng hoặc biểu hiện thích hợp cho các vector mã hóa polypeptit, bao gồm các chủng nấm và nấm men mà con đường glycosyl hóa của nó đã được “người hóa”, dẫn đến việc sản xuất polypeptit với kiểu glycosyl hóa ở người một phần hoặc hoàn toàn. xem Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004), và Li et al., Nat Biotech 24, 210-215 (2006). Tế bào chủ thích hợp để biểu hiện các polypeptit (được glycosyl hóa) mà cũng thu được từ sinh vật đa bào (động vật không xương sống và động vật có xương sống). Ví dụ về tế bào động vật không xương sống bao gồm thực vật và tế bào côn trùng. Một số chủng baculovirus đã được xác định mà có thể được sử dụng kết hợp với tế bào côn trùng, cụ thể là để chuyển nhiễm tế bào *Spodoptera frugiperda*. Môi trường nuôi cấy tế bào thực vật cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Xem ví dụ patent Mỹ số 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, và 6,417,429 (mô tả công nghệ PLANTIBODIES™ để sản xuất kháng thể trong các thực vật chuyển gen). Tế bào động vật có xương sống cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Ví dụ, dòng tế bào động vật có vú được làm thích ứng để phát triển trong hỗn dịch có thể là hữu ích. Ví dụ khác về dòng tế bào chủ động vật có vú hữu ích là dòng CV1 ở thận khi được biến nạp bởi SV40 (COS-7); dòng phôi thận ở người (tế bào 293 hoặc 293T như được mô tả, ví dụ, trong Graham et al., J Gen Virol 36, 59 (1977)), tế bào thận ở chuột đồng con (BHK), tế bào sertoli ở chuột (TM4 như được mô tả, ví dụ, trong Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)), tế bào thận ở khỉ (CV1), tế bào thận ở khỉ xanh châu Phi (VERO-76), tế bào caxinom ở cổ người (HELA), tế bào thận ở chó (MDCK), tế bào gan ở chuột trâu (BRL 3A), tế bào phổi ở người (W138), tế bào gan ở người (Hep G2), tế bào khối u ở vú chuột (MMT 060562), tế bào TRI (như được mô tả, ví dụ, trong Mather et al., Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)), tế bào MRC 5, và tế bào FS4. Các dòng tế bào chủ ở động vật có vú hữu ích khác bao gồm tế bào trứng chuột đồng Trung Hoa (CHO), bao gồm tế bào hfr CHO (Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)); và các dòng tế bào u tủy như YO, NS0, P3X63 và Sp2/0. Để xem xét các dòng tế bào chủ ở động vật có vú nhất định thích hợp cho sự sản sinh protein, ví dụ, xem, Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo,

ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003). Tế bào chủ gồm tế bào được nuôi cấy, ví dụ, tế bào động vật có vú được nuôi cấy, tế bào nấm men, tế bào côn trùng, tế bào vi khuẩn và tế bào thực vật, định rõ chỉ một số tế bào, mà cả tế bào được bao gồm trong động vật chuyển gen, thực vật chuyển gen hoặc cây trồng được nuôi cấy hoặc mô động vật. Theo một phương án, tế bào chủ là tế bào có nhân điển hình, tốt hơn nếu là tế bào động vật có vú, như tế bào trứng chuột đồng Trung Hoa (CHO), tế bào phôi thận ở người (HEK) hoặc tế bào dạng lympho (ví dụ, tế bào Y0, NS0, Sp20). Các kỹ thuật tiêu chuẩn đã được biết trong lĩnh vực để biểu hiện các gen lạ trong các hệ này. Các tế bào biểu hiện polypeptit chứa chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của miền gắn kết kháng nguyên như kháng thể, có thể được thiết kế di truyền sao cho cũng biểu hiện polypeptit khác của chuỗi kháng thể sao cho sản phẩm được biểu hiện là kháng thể mà có cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Theo một phương án, phương pháp sản xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây được đề xuất, trong đó phương pháp này bao gồm nuôi cấy tế bào chủ chứa polynucleotit mã hóa cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, như được đề xuất trong bản mô tả này, trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, và thu hồi phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T từ tế bào chủ (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào chủ).

Thành phần của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được dung hợp về mặt di truyền với nhau. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được thiết kế sao cho thành phần của nó được dung hợp trực tiếp với nhau hoặc gián tiếp thông qua trình tự liên kết. Hợp phần và chiều dài của liên kết có thể được xác định theo các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực và có thể được thử nghiệm về hiệu quả. Ví dụ về trình tự liên kết giữa các thành phần khác nhau của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được tìm thấy trong các trình tự được đề xuất trong bản mô tả này. Các trình tự khác cũng có thể được bao gồm để hợp nhất vị trí phân cắt để tách các thành phần riêng của sự dung hợp nếu muốn, ví dụ trình tự nhận biết endopeptidaza.

Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều gốc gắn kết kháng nguyên của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm ít nhất một vùng biến đổi kháng thể có khả năng gắn kết chất xác định kháng nguyên. Các vùng biến đổi có thể hình thành một phần của và thu được từ kháng thể có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên và các mảnh của chúng. Các phương pháp để sản xuất kháng thể đa dòng và kháng thể đơn dòng đã được biết rõ trong lĩnh vực (ví dụ, xem Harlow and Lane, "Antibodies, laboratory

manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Kháng thể không có trong tự nhiên có thể được cấu trúc sử dụng tổng hợp peptit pha rắn, có thể được sản xuất bằng cách tái tổ hợp (ví dụ như được nêu trong patent Mỹ số 4,186,567) hoặc có thể thu được, ví dụ, bằng cách sàng lọc thư viện tổ hợp chứa các chuỗi nặng biến đổi và các chuỗi nhẹ biến đổi (ví dụ, xem patent Mỹ số 5,969,108 cấp cho McCafferty).

Các loài động vật bất kỳ của kháng thể, mảnh kháng thể, miền gắn kết kháng nguyên hoặc vùng biến đổi có thể được sử dụng trong phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây. Các kháng thể, các mảnh kháng thể, miền gắn kết kháng nguyên hoặc các vùng biến đổi không giới hạn có thể sử dụng ở đây có thể có nguồn gốc từ chuột, động vật linh trưởng hoặc người. Nếu phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được dùng chỉ để sử dụng ở người, dạng khám của kháng thể có thể được sử dụng trong đó các vùng không đổi của kháng thể là từ người. Dạng được người hóa hoặc ở người hoàn toàn của kháng thể cũng có thể được điều chế theo các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực (xem ví dụ patent Mỹ số 5,565,332 cấp cho Winter). Người hóa thể đạt được bằng các phương pháp khác nhau bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở (a) ghép các CDR không phải ở người (ví dụ, kháng thể thể cho) lên trên khung ở người (ví dụ kháng thể thể nhận) và các vùng không đổi giữ hoặc không giữ được phần khung còn lại có tính quyết định (ví dụ các phần khung mà là quan trọng để giữ ái lực liên kết kháng nguyên tốt hoặc các chức năng kháng thể), (b) ghép chỉ các vùng xác định tính đặc hiệu không phải người (các SDR hoặc các a-CDR; các gốc quyết định cho sự tương tác kháng thể-kháng nguyên) lên trên khung ở người và các vùng không đổi, hoặc (c) cấy ghép toàn bộ miền biến đổi không phải ở người, nhưng "che giấu" chúng với phần giống như người bằng cách thay thế các gốc bề mặt. Kháng thể được người hóa và các phương pháp sản xuất chúng được xem xét, ví dụ, trong Almagro and Fransson, *Front Biosci* 13, 1619-1633 (2008), và được mô tả thêm, ví dụ, trong Riechmann et al., *Nature* 332, 323-329 (1988); Queen et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033 (1989); patent Mỹ số 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321, và 7,087,409; Jones et al., *Nature* 321, 522-525 (1986); Morrison et al., *Proc Natl Acad Sci* 81, 6851-6855 (1984); Morrison and Oi, *Adv Immunol* 44, 65-92 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239, 1534-1536 (1988); Padlan, *Molec Immun* 31(3), 169-217 (1994); Kashmiri et al., *Methods* 36, 25-34 (2005) (mô tả ghép SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol Immunol* 28, 489-498 (1991) (mô tả "xuất hiện trở lại"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36, 43-60 (2005) (mô tả "FR dao động"); và Osbourn et al., *Methods* 36, 61-68 (2005) và Klimka et al., *Br J Cancer* 83, 252-260 (2000) (mô tả phương pháp "chọn lọc có hướng dẫn" đối với dao động FR).

Kháng thể ở người và các vùng biến đổi ở người có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực. Kháng thể ở người thông thường được mô tả trong van Dijk and van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 368-74 (2001) và Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 450-459 (2008). Các vùng biến đổi ở người có thể hình thành một phần của và thu được từ kháng thể đơn dòng ở người được tạo ra bằng phương pháp tế bào lai (ví dụ, xem *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). Kháng thể ở người và các vùng biến đổi ở người cũng có thể được điều chế bằng cách sử dụng chất kháng nguyên cho động vật chuyển gen mà đã được biến đổi để sản xuất kháng thể nguyên vẹn ở người hoặc kháng thể nguyên vẹn với các vùng biến đổi ở người phản ứng với thách thức kháng nguyên (ví dụ, xem Lonberg, *Nat Biotech* 23, 1117-1125 (2005)). Các kháng thể ở người và các vùng biến đổi ở người cũng có thể được tạo ra bằng cách phân tách các trình tự vùng biến đổi đơn dòng Fv được chọn từ các thư viện thể thực khuẩn thu được ở người (ví dụ, xem, Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178, 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001); và McCafferty et al., *Nature* 348, 552-554; Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991)). Thể thực khuẩn thường thể hiện các mảnh kháng thể, hoặc là các mảnh chuỗi đơn Fv (scFv) hoặc là các mảnh Fab.

Theo các phương án nhất định, các gốc gắn kết kháng nguyên có thể sử dụng ở đây được cấu trúc di truyền để có ái lực liên kết tăng cường, ví dụ, theo các phương pháp được nêu trong công bố đơn sáng chế Mỹ số 2004/0132066. Khả năng của các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây để gắn kết với chất xác định kháng nguyên đặc hiệu có thể được xác định hoặc thông qua thử nghiệm hấp phụ miễn dịch được liên kết enzym (ELISA) hoặc các kỹ thuật khác quen thuộc với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (được phân tích trên hệ BIACORE T100) (Liljeblad, et al., *Glyco J* 17, 323-329 (2000)), và thử nghiệm liên kết truyền thống (Heeley, *Endocr Res* 28, 217-229 (2002)). Thử nghiệm cạnh tranh có thể được sử dụng để nhận diện kháng thể, mảnh kháng thể, miền gắn kết kháng nguyên hoặc miền biến đổi mà cạnh tranh với kháng thể tham chiếu để gắn kết với kháng nguyên cụ thể, ví dụ kháng thể mà cạnh tranh với kháng thể V9 để gắn kết với CD3. Theo các phương án nhất định, kháng thể cạnh tranh này gắn kết với cùng epitop (ví dụ epitop thẳng hoặc cấu hình) được liên kết bằng kháng thể tham chiếu. Các phương pháp minh họa chi tiết cho bản đồ epitop kháng thể gắn kết với nó được đưa ra trong tài liệu: Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," trong tài liệu: *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa,

NJ). Trong thử nghiệm cạnh tranh minh họa, kháng nguyên được giữ cố định (ví dụ CD3) được ủ trong dung dịch chứa kháng thể được gắn nhãn thứ nhất mà gắn kết với kháng nguyên (ví dụ kháng thể V9) và kháng thể không được gắn nhãn thứ hai mà được thử nghiệm đối với khả năng của nó để cạnh tranh với kháng thể thứ nhất để gắn kết với kháng nguyên. Kháng thể thứ hai có thể là có mặt trong dịch nổi tế bào thể lai. Để làm đối chứng, kháng nguyên được giữ cố định được ủ trong dung dịch chứa kháng thể được gắn nhãn thứ nhất nhưng không phải kháng thể không được gắn nhãn thứ hai. Sau khi ủ trong các điều kiện cho phép để liên kết kháng thể thứ nhất với kháng nguyên, kháng thể dư không được liên kết được loại ra, và lượng của nhãn có liên quan đến kháng nguyên được giữ cố định được xác định. Nếu lượng nhãn có liên quan đến kháng nguyên được giữ cố định về cơ bản giảm trong mẫu thử nghiệm đối với mẫu đối chứng, chỉ ra rằng kháng thể thứ hai cạnh tranh với kháng thể thứ nhất để gắn kết với kháng nguyên. Xem Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được điều chế như được nêu trong bản mô tả này có thể được tinh chế bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực như sắc ký lỏng cao áp, sắc ký trao đổi ion, điện di gen, sắc ký ái lực, sắc ký loại trừ theo kích cỡ, và các kỹ thuật tương tự. Các điều kiện thực tế được sử dụng để tinh chế protein cụ thể một phần sẽ phụ thuộc vào các yếu tố như điện tích toàn phần, mức độ kỵ nước, mức độ ưa nước v.v. và sẽ là rõ ràng đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Để tinh chế sắc ký ái lực, kháng thể, phối tử, thụ thể hoặc kháng nguyên có thể được sử dụng cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T liên kết vào. Ví dụ, để tinh chế sắc ký ái lực của các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây, chất gốc với protein A hoặc protein G có thể được sử dụng. Sắc ký ái lực protein A hoặc G theo sau và sắc ký loại trừ theo kích cỡ có thể được sử dụng để phân lập phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T về cơ bản như được nêu trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Độ tinh khiết của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được xác định bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp phân tích đã được biết rõ bao gồm điện di gen, sắc ký lỏng cao áp, và phương pháp tương tự. Ví dụ, các protein dung hợp chuỗi nặng được biểu hiện như được nêu trong phần ví dụ thực hiện sáng chế được thể hiện là nguyên vẹn và được tập hợp lại một cách thích hợp như được chứng minh bằng cách làm giảm SDS-PAGE (ví dụ, xem Fig.2). Ba dải được phân giải ở khoảng xấp xỉ Mr 25.000, Mr 50.000 và Mr 75.000, tương ứng với phân tử lượng được dự đoán của

phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của protein dung hợp chuỗi nhẹ, chuỗi nặng và chuỗi nặng/chuỗi nhẹ.

Thử nghiệm

Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được đề xuất trong bản mô tả này có thể được nhận biết, được sàng lọc đối với, hoặc được đặc trưng cho các tính chất lý/hóa học của chúng và/hoặc các hoạt tính sinh học bằng các thử nghiệm khác nhau đã biết trong lĩnh vực.

Thử nghiệm ái lực

Ái lực của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cho thụ thể Fc hoặc kháng nguyên đích có thể được xác định theo các phương pháp được nêu trong các ví dụ thực hiện bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR), sử dụng dụng cụ tiêu chuẩn như dụng cụ BIAcore (GE Healthcare), và các thụ thể hoặc các protein đích như có thể thu được bằng cách biểu hiện tái tổ hợp. Theo cách khác, gắn kết của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cho các thụ thể khác nhau hoặc kháng nguyên đích có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các dòng tế bào biểu hiện thụ thể cụ thể hoặc kháng nguyên đích, ví dụ bằng bào kế chảy (FACS). Các phương án minh họa cụ thể và ví dụ để xác định ái lực liên kết được bộc lộ dưới đây và trong các Ví dụ thực hiện sau đây dưới đây.

Theo một phương án, K_D được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt sử dụng máy BIACORE® T100 (GE Healthcare) ở nhiệt độ 25°C.

Để phân tích sự tương tác giữa phân tử Fc và các thụ thể Fc, thụ thể Fc tái tổ hợp có đuôi His được giữ bởi kháng thể kháng-Penta His (Qiagen) cố định trên các mảnh CM5 và các cấu trúc đặc hiệu kép được sử dụng làm chất phân tích. Một cách ngắn gọn, các mảnh cảm biến sinh học dextran được carboxymetyl hóa (CM5, GE Healthcare) được hoạt hóa bằng N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydroclorua (EDC) và N-hydroxysuccinimide (NHS) theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Kháng thể kháng Penta-His được pha loãng bằng 10 mM natri axetat, độ pH = 5,0, đến 40 µg/ml trước khi bơm ở tốc độ chảy là 5 µl/phút để đạt được khoảng 6500 đơn vị phản ứng (RU) của protein liên hợp. Sau khi bơm phốt từ, 1 M etanolamin được bơm để phong bế các nhóm chưa được phản ứng. Sau đó thụ thể Fc được giữ trong 60 giây ở 4 hoặc 10 nM. Để xác định động lực, pha loãng theo dãy bốn lần của cấu trúc đặc hiệu kép (nằm trong khoảng từ 500 nM đến 4000 nM) được bơm vào trong HBS-EP (GE Healthcare, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05 % chất hoạt động bề mặt P20, pH 7,4) ở nhiệt độ 25°C ở tốc độ chảy là 30 µl/phút trong 120 giây.

Để xác định ái lực với kháng nguyên đích, các cấu trúc đặc hiệu kép được giữ bởi kháng thể đặc hiệu Fab kháng người (GE Healthcare) mà được cố định trên bề mặt mảnh cảm biến CM5 hoạt hóa như được mô tả đối với kháng thể kháng Penta-His. Lượng cuối cùng của protein liên hợp là khoảng 12000 RU. Các cấu trúc đặc hiệu kép được giữ trong 90 giây ở 300 nM. Kháng nguyên đích được đưa qua các tế bào chảy trong 180 giây với nồng độ nằm trong khoảng từ 250 đến 1000 nM với tốc độ chảy là 30 μ l/phút. Sự phân ly được theo dõi trong 180 giây.

Sự khác biệt chỉ số khúc xạ thể tích được hiệu chỉnh bằng cách trừ đi đáp ứng thu được trên tế bào chảy tham chiếu. Phản ứng trạng thái ổn định được sử dụng để thu được hằng số phân ly K_D bằng cách điều chỉnh đường cong không tuyến tính của đường đẳng nhiệt liên kết Langmuir. Tốc độ liên kết (k_{on}) và tốc độ phân ly (k_{off}) được tính sử dụng mô hình liên kết Langmuir đơn giản theo kiểu một một (BIAcore® T100 Evaluation Software version 1.1.1) bằng cách liên kết ăn khớp đồng thời và gram cảm biến phân ly. Hằng số phân ly cân bằng (K_D) được tính bằng tỷ lệ k_{off}/k_{on} . Xem, ví dụ, Chen et al., J Mol Biol 293, 865-881 (1999).

Thử nghiệm hoạt tính

Hoạt tính sinh học của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây có thể được xác định bằng các thử nghiệm khác nhau như được nêu trong ví dụ thực hiện sáng chế. Các hoạt tính sinh học ví dụ có thể bao gồm kích thích sự tăng sinh tế bào T, kích thích tín hiệu trong các tế bào T, kích thích sự biểu hiện của gen đánh dấu hoạt hóa trong các tế bào T, kích thích sự tiết xytokin bởi tế bào T, kích thích sự phân giải của các tế bào đích như tế bào khối u, và kích thích sự thoái lui khối u và/hoặc cải thiện sự sống sót.

Hợp phần, chế phẩm, và đường dùng

Theo khía cạnh khác, được đề xuất ở đây là dược phẩm chứa phân tử bất kỳ trong số phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T trong bản mô tả này, ví dụ, để sử dụng trong phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp trị liệu dưới đây. Theo một phương án, dược phẩm chứa phân tử bất kỳ trong số phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được đề xuất trong bản mô tả này và chất mang dược dụng. Theo phương án khác, dược phẩm chứa phân tử bất kỳ trong số phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được đề xuất trong bản mô tả này và ít nhất một chất trị liệu khác, ví dụ, như được nêu dưới đây.

Còn được đề xuất là phương pháp sản xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây ở dạng thích hợp để dùng in vivo, phương pháp này bao gồm các bước (a) thu phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây, và (b) tạo công thức phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T với ít nhất một chất mang dược dụng, bằng cách đó chế phẩm của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được phối trộn để dùng in vivo.

Dược phẩm được bộc lộ ở đây bao gồm lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu của một hoặc nhiều phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được hòa tan hoặc được phân tán trong chất mang dược dụng. Các cụm từ "dược dụng hoặc có thể chấp nhận được về mặt dược học" chỉ toàn bộ phân tử và hợp phần mà thường là không độc cho thể nhận ở các liều lượng và các hàm lượng được sử dụng, tức là, không tạo ra tác dụng phụ, phản ứng dị ứng hoặc phản ứng không mong muốn khác khi được dùng cho động vật, như, ví dụ, người, khi cần. Chế phẩm thuốc chứa ít nhất một phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T và tùy chọn một thành phần hoạt tính khác sẽ được các người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết, như được minh họa bởi Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990. Ngoài ra, để sử dụng cho động vật (ví dụ, ở người), sẽ được hiểu rằng việc điều chế cần phải đáp ứng tiêu chuẩn vô trùng, gây sốt, độ an toàn chung và độ tinh khiết như được yêu cầu bởi FDA Office of Biological Standards hoặc các cơ quan tương ứng ở các nước khác. Hợp phần được ưu tiên là chế phẩm được làm đông khô hoặc dung dịch chứa nước. Trong bản mô tả này, "chất mang dược dụng" bao gồm bất kỳ và tất cả các dung môi, chất đệm, môi trường thể phân tán, các lớp phủ, các chất hoạt động bề mặt, các chất chống oxy hóa, các chất bảo quản (ví dụ các tác nhân kháng khuẩn, các tác nhân kháng nấm), các tác nhân đẳng trương, các tác nhân làm chậm sự hấp phụ, các muối, các chất bảo quản, các chất chống oxy hóa, các protein, các thuốc, các chất ổn định thuốc, các polyme, các gel, các chất liên kết, các tá dược, các chất làm phân rã, các chất bôi trơn các chất tạo ngọt, các chất tạo hương, thuốc nhuộm, như các nguyên liệu và các hỗn hợp của chúng, như sẽ được các người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật biết (ví dụ, xem, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329). Ngoại trừ chất mang không tương hợp với thành phần hoạt tính, việc sử dụng nó trong trị liệu hoặc dược phẩm được dự tính.

Hợp phần này có thể bao gồm các loại chất mang khác nhau phụ thuộc vào việc nó được sử dụng ở dạng rắn, lỏng hay sol khí, và có cần phải vô trùng cho đường dùng để tiêm hay không. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây

(và chất trị liệu khác bất kỳ) có thể được sử dụng qua đường tĩnh mạch, qua đường da, trong động mạch, trong bụng, trong tổn thương, trong sọ, trong khớp, trong ống tuyến tiền liệt, trong lá lách, trong thận, trong màng phổi, trong khí quản, trong mũi, nội hấp, trong âm đạo, trong trực tràng, trong rốn, trong màng nhầy, trong bụng, dưới da, dưới kết mạc, trong bọc, qua màng nhầy, trong màng ngoài tim, trong rốn, trong mắt, qua đường miệng, dùng tại chỗ, dùng cục bộ, bằng cách xông (ví dụ xông dạng sol khí), tiêm, truyền, truyền liên tục, truyền tại chỗ thấm đẫm các tế bào đích một cách trực tiếp, thông qua ống thông, thông qua thụt rửa, trong thuốc kem, trong hợp phần lipit (ví dụ các liposom), hoặc bằng các phương pháp khác hoặc phương pháp kết hợp bất kỳ nêu trên như sẽ được các người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật biết (ví dụ, xem, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990). Việc dùng ngoài đường tiêu hóa, cụ thể, tiêm trong tĩnh mạch, được sử dụng thông dụng nhất để sử dụng các phân tử polypeptit như phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây.

Hợp phần dùng ngoài đường tiêu hóa gồm các hợp phần được tạo ra để dùng bằng cách tiêm, ví dụ tiêm dưới da, trong bì, trong thương tổn, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong cơ, trong vỏ hoặc trong bụng. Để tiêm, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây có thể được phối trộn trong dung dịch chứa nước, tốt hơn nếu là trong chất đệm có thể tương hợp về mặt sinh lý như dung dịch Hanks, dung dịch Ringer, hoặc muối đệm sinh lý. Dung dịch này có thể chứa các tác nhân tạo công thức như tác nhân tạo huyền phù, làm ổn định và/hoặc phân tán. Theo cách khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể là ở dạng bột để tạo thành môi trường dẫn thuốc thích hợp, ví dụ, nước không có pyrogen vô trùng, trước khi sử dụng. Dung dịch tiêm vô trùng được điều chế bằng cách đưa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở dạng với lượng cần thiết trong dung môi thích hợp với các thành phần khác nhau được liệt kê dưới đây, khi cần. Vô trùng có thể được thực hiện dễ dàng, ví dụ, bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng. Thông thường, các thể phân tán được điều chế bằng cách đưa các thành phần hoạt tính đã được làm vô trùng khác nhau vào trong môi trường dẫn thuốc vô trùng chứa môi trường phân tán bazơ và/hoặc các thành phần khác. Trong trường hợp bột vô trùng để điều chế dung dịch tiêm vô trùng, các hỗn dịch hoặc nhũ tương, các phương pháp điều chế được ưu tiên là các kỹ thuật làm khô chân không hoặc làm khô lạnh tạo ra bột của thành phần hoạt tính cộng với thành phần mong muốn khác bất kỳ từ môi trường lỏng được lọc vô trùng trước đây của chúng. Môi trường lỏng cần được đệm thích hợp nếu cần và chất làm loãng lỏng đầu tiên cần làm đẳng trương trước khi bơm với lượng

nước muối hoặc glucoza đủ. Hợp phần này cần phải ổn định trong các điều kiện sản xuất và lưu giữ, và được bảo quản chống lại tác dụng nhiễm bẩn của các vi sinh vật, như vi khuẩn và nấm. Nó sẽ được đánh giá rằng nhiễm bẩn nội độc tố cần được giữ tối thiểu ở mức an toàn, ví dụ, nhỏ hơn 0,5 ng/mg protein. Các chất mang được dùng thích hợp gồm, nhưng không giới hạn ở: chất đệm như phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; các chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic và methionin; các chất bảo quản (như octadexyldimetylbenzyl amoni clorua; hexameton clorua; benzalkoni clorua; benzetoni clorua; phenol, rượu butylic hoặc benzylic; alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); các polypeptit phân tử lượng thấp (ít hơn khoảng 10 gốc); các protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc các globulin miễn dịch; các polyme ưa nước như polyvinylpyrrolidon; các axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; monosacarit, disacarit, và các hydrat cacbon khác bao gồm glucoza, manosa, hoặc các dextrin; các tác nhân chelat như EDTA; đường như sucroza, mannitol, trehaloza hoặc sorbitol; các ion trái dấu hình thành muối như natri; các phức kim loại (ví dụ các phức Zn-protein); và/hoặc các chất hoạt động bề mặt dạng không ion như polyetylen glycol (PEG). Các hỗn dịch tiêm chứa nước có thể chứa hợp chất làm tăng độ nhớt của hỗn dịch, như natri carboxymetyl xenluloza, sorbitol, dextran, hoặc dạng tương tự. Tùy chọn, hỗn dịch cũng có thể chứa các chất ổn định thích hợp hoặc các chất làm tăng khả năng hòa tan của hợp chất cho phép điều chế dung dịch nồng độ cao. Ngoài ra, các hỗn dịch của các hoạt chất có thể được điều chế dưới dạng hỗn dịch tiêm được dạng dầu thích hợp. Các dung môi ưa mỡ thích hợp hoặc môi trường dẫn thuốc gồm các dầu béo như dầu vừng, hoặc các este axit béo tổng hợp, như etyl cleat hoặc triglyxerit, hoặc các liposom.

Các thành phần hoạt tính có thể được giữ trong các vi nang được điều chế, ví dụ, bằng các kỹ thuật giọt tụ hoặc bằng cách polyme hóa ở bề mặt phân cắt pha, ví dụ, lần lượt là hydroxymetylxenluloza hoặc các vi nang gelatin và các vi nang poly-(metylmetylacrylat), trong hệ vận chuyển thuốc dạng keo (ví dụ, các liposom, các vi cầu albumin, các vi nhũ tương, các hạt dạng nano và các vi nang nano) hoặc trong đại nhũ tương. Các kỹ thuật này được nêu trong tài liệu: Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed. Mack Printing Company, 1990). Các chế phẩm giải phóng kéo dài có thể được điều chế. Ví dụ thích hợp về các chế phẩm giải phóng kéo dài gồm các chất kết dính bán thấm của các polyme kỵ nước dạng rắn có chứa polypeptit, mà các chất kết dính là ở dạng của các vật thể có hình dạng, ví dụ các màng, hoặc các vi nang. Theo các phương án cụ thể, sự hấp phụ kéo dài của hợp phần tiêm

có thể được tạo ra bằng cách sử dụng trong hợp phần của các tác nhân làm chậm hấp phụ, như, ví dụ, nhôm monostearat, gelatin hoặc các hỗn hợp của chúng.

Ngoài các hợp phần được mô tả trước đây, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cũng có thể được phối trộn dưới dạng chế phẩm chứa. Chế phẩm có tác dụng lâu dài này có thể được sử dụng bằng cách cấy ghép (ví dụ dưới da hoặc trong màng nhầy) hoặc bằng cách tiêm trong cơ. Như vậy, ví dụ, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được phối trộn với nguyên liệu polyme hoặc kỵ nước thích hợp (ví dụ như nhũ tương trong dầu chấp nhận được) hoặc nhựa trao đổi ion, hoặc là các dẫn xuất tan được ít, ví dụ, là muối tan ít.

Dược phẩm chứa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây có thể được sản xuất bằng các quy trình trộn, hòa tan, nhũ hóa, bao nang, bao hoặc đông khô thông thường. Dược phẩm có thể được phối trộn theo cách thông thường bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, tá dược hoặc các chất phụ gia có thể chấp nhận được về mặt sinh lý mà tạo điều kiện thuận lợi cho việc xử lý các protein thành các chế phẩm mà có thể được sử dụng trong dược phẩm. Chế phẩm thích hợp phụ thuộc vào đường dùng được chọn.

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được phối trộn thành hợp phần ở dạng axit hoặc bazơ tự do, dạng trung tính hoặc dạng muối. Các muối được dùng là các muối mà hầu như giữ được hoạt tính sinh của axit hoặc bazơ tự do. Các muối này là muối cộng axit, ví dụ, các muối được tạo thành với các nhóm amin tự do của hợp phần có protein, hoặc được tạo thành với các axit vô cơ như ví dụ, axit clohydric hoặc axit phosphoric, hoặc các axit hữu cơ như axit axetic, axit oxalic, axit tartric hoặc axit mandelic. Muối được tạo thành với các nhóm carboxyl tự do cũng có thể thu được từ bazơ vô cơ như ví dụ, natri, kali, amoni, canxi hoặc sắt (III) hydroxit; hoặc bazơ hữu cơ này là isopropylamin, trimetylamin, histidin hoặc procain. Các muối được liệu có xu hướng tan nhiều hơn trong các dung môi chứa nước hoặc các dung môi có proron khác so với các dạng bazơ tự do tương ứng.

Các phương pháp trị liệu và các hợp phần

Phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được đề xuất trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong các phương pháp trị liệu. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây có thể được sử dụng làm các chất trị liệu miễn dịch, ví dụ để điều trị bệnh ung thư.

Để sử dụng trong các phương pháp trị liệu, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây sẽ được bào chế, được định lượng và được dùng theo cách phù hợp với thực hành y tế tốt. Các yếu tố để xem xét trong trường hợp này, bao gồm rối loạn cụ thể được điều trị, động vật có vú cụ thể được điều trị, các tình trạng bệnh lý lâm sàng của từng bệnh nhân, nguyên nhân của rối loạn, điểm vận chuyển chất, phương pháp dùng, lịch dùng, và các yếu tố khác đã được người thực hành trong lĩnh vực y tế biết.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây để dùng làm thuốc. Theo các khía cạnh khác, sáng chế mô tả phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây để sử dụng trong điều trị bệnh. Theo các phương án nhất định, sáng chế mô tả phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây để sử dụng trong phương pháp điều trị. Theo một phương án, sáng chế mô tả phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T như được nêu trong bản mô tả này để sử dụng trong điều trị bệnh ở cá thể cần chúng. Theo các phương án nhất định, sáng chế mô tả phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T để sử dụng trong phương pháp điều trị cá thể mắc bệnh bao gồm việc cho cá thể dùng một lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T. Theo các phương án nhất định, bệnh cần điều trị là bệnh tăng sinh. Theo phương án cụ thể, bệnh là bệnh ung thư. Theo các phương án nhất định, phương pháp này còn bao gồm bước cho cá thể dùng một lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu của ít nhất một chất trị liệu khác, ví dụ, tác nhân kháng ung thư nếu như bệnh cần điều trị là bệnh ung thư. Theo các phương án khác, sáng chế mô tả phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T như được nêu trong bản mô tả này để sử dụng trong việc kích thích sự phân giải của tế bào đích, cụ thể là tế bào khối u. Theo các phương án nhất định, sáng chế mô tả phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T để sử dụng trong phương pháp kích thích sự phân giải của tế bào đích, cụ thể là tế bào khối u, ở cá thể bao gồm việc cho cá thể dùng một lượng hữu hiệu của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T để kích thích sự phân giải của tế bào đích. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên là động vật có vú, tốt hơn nếu là người.

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây trong việc bào chế hoặc điều chế thuốc. Theo một phương án, thuốc là để điều trị bệnh ở cá thể cần chúng. Theo phương án khác, thuốc là để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh bao gồm việc cho cá thể mắc bệnh dùng một lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu của thuốc. Theo các phương án nhất định, bệnh cần điều

trị là bệnh tăng sinh. Theo phương án cụ thể, bệnh là bệnh ung thư. Theo một phương án, phương pháp này còn bao gồm bước cho cá thể dùng một lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu của ít nhất một chất trị liệu khác, ví dụ, tác nhân kháng ung thư nếu như bệnh cần điều trị là bệnh ung thư. Theo phương án khác, thuốc là để kích thích sự phân giải của tế bào đích, cụ thể là tế bào khối u. Theo phương án khác nữa, thuốc này là để sử dụng trong phương pháp kích thích sự phân giải của tế bào đích, cụ thể là tế bào khối u, ở cá thể bao gồm việc cho cá thể dùng một lượng hữu hiệu của thuốc để kích thích sự phân giải của tế bào đích. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên có thể là động vật có vú, tốt hơn nếu là người.

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp để điều trị bệnh. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm việc cá thể mắc bệnh dùng một lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế. Theo một phương án, hợp phần được sử dụng cho cá thể đã nêu, chứa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây ở dạng dược dụng. Theo các phương án nhất định, bệnh cần điều trị là bệnh tăng sinh. Theo phương án cụ thể, bệnh là bệnh ung thư. Theo các phương án nhất định, phương pháp này còn bao gồm bước cho cá thể dùng một lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu của ít nhất một chất trị liệu khác, ví dụ, tác nhân kháng ung thư nếu như bệnh cần điều trị là bệnh ung thư. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên có thể là động vật có vú, tốt hơn nếu là người.

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp để kích thích sự phân giải của tế bào đích, cụ thể là tế bào khối u. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm việc cho tế bào đích tiếp xúc với phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế với sự có mặt của tế bào T, cụ thể là tế bào T gây độc tế bào. Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp để kích thích sự phân giải của tế bào đích, cụ thể là tế bào khối u, ở cá thể. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm việc cho cá thể dùng một lượng hữu hiệu của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T để kích thích sự phân giải của tế bào đích. Theo một phương án, “cá thể” là người.

Theo các phương án nhất định, bệnh cần điều trị là bệnh tăng sinh, cụ thể là bệnh ung thư. Các ví dụ không mang tính giới hạn về bệnh ung thư bao gồm ung thư bàng quang, ung thư não, ung thư đầu và cổ, ung thư tụy, ung thư phổi, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư tử cung, ung thư cổ, ung thư màng trong dạ con, ung thư thực quản, ung thư ruột kết, ung thư trực tràng ruột kết, ung thư trực tràng, ung thư dạ dày, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư máu, ung thư da, caxinom tế bào vảy, ung thư xương, và ung thư thận. Các rối loạn tăng sinh

tế bào khác mà có thể được điều trị sử dụng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở mô ung thư nằm ở: bụng, xương, vú, hệ tiêu hóa, gan, tuyến tụy, màng bụng, tuyến nội tiết (tuyến thận, tuyến cận giáp, tuyến yên, tinh hoàn, buồng trứng, tuyến ức, tuyến giáp), mắt, đầu và cổ, hệ thần kinh (trung ương và ngoại vi), hệ bạch huyết, vùng chậu, da, mô mềm, lá lách, vùng ngực, và hệ niệu sinh dục. Còn được bao gồm là các tình trạng bệnh hoặc tổn thương tiền ung thư và các bệnh di căn ung thư. Theo các phương án nhất định, ung thư được chọn từ nhóm gồm ung thư tế bào thần, ung thư da, ung thư phổi, ung thư trực tràng ruột kết, ung thư vú, ung thư não, ung thư đầu và cổ. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ nhận ra rằng trong nhiều trường hợp, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể không mang lại chữa trị mà có thể chỉ mang lại một phần lợi ích. Theo một số phương án, sự biến đổi sinh lý có một số lợi ích cũng được xem là có lợi về mặt trị liệu. Như vậy, theo một số phương án, lượng của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T mà tạo ra sự biến đổi sinh lý được coi là "lượng hữu hiệu" hoặc "lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu". Đối tượng, bệnh nhân, hoặc cá thể cần điều trị thường là động vật có vú, cụ thể hơn, là người.

Theo một số phương án, lượng hữu hiệu của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây được sử dụng cho tế bào. Theo các phương án khác, lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây được sử dụng cho cá thể để điều trị bệnh.

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, liều lượng thích hợp của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây (khi được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu khác) sẽ phụ thuộc vào loại của bệnh cần điều trị, đường dùng, trọng lượng cơ thể của bệnh nhân, loại phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, mức độ nghiêm trọng và tiến triển của bệnh, xem là phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được sử dụng cho các mục đích ngăn ngừa hoặc điều trị, can thiệp trị liệu trước đây hoặc đồng thời, tiền sử lâm sàng của bệnh nhân và phản ứng với phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, và sự cân nhắc của bác sĩ. Bác sĩ chịu trách nhiệm cho việc dùng, trong trường hợp bất kỳ, sẽ xác định hàm lượng của (các) thành phần hoạt tính trong hợp phần và (các) liều lượng thích hợp cho đối tượng là cá thể. Lịch trình định lượng khác nhau bao gồm nhưng không bị giới hạn ở việc dùng một lần hoặc nhiều lần qua các thời điểm khác nhau, dùng liều lớn, và truyền theo xung được dự tính trong bản mô tả này.

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được áp dụng một cách thích hợp cho bệnh nhân một lần hoặc một loạt điều trị. Phụ thuộc vào loại và mức độ nghiêm trọng của bệnh, khoảng 1 $\mu\text{g/kg}$ đến 15 mg/kg (ví dụ 0,1 mg/kg – 10 mg/kg) của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể là liều lượng ứng cử ban đầu để sử dụng cho bệnh nhân, xem là, ví dụ, dùng một hay nhiều lần, hoặc là truyền liên tục. Một liều lượng dùng hằng ngày thông thường có thể nằm trong khoảng từ khoảng 1 $\mu\text{g/kg}$ đến 100 mg/kg hoặc lớn hơn, phụ thuộc vào các yếu tố được nêu trên. Để dùng lặp lại trong vài ngày hoặc lâu hơn, phụ thuộc vào tình trạng bệnh, việc điều trị nhìn chung sẽ được kéo dài cho đến khi chặn được triệu chứng bệnh xuất hiện mong muốn. Một liều lượng minh họa của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T sẽ nằm trong khoảng từ 0,005 mg/kg đến 10 mg/kg . Theo các ví dụ không giới hạn khác, liều lượng này cũng có thể bao gồm từ khoảng 1 microgam/kg thể trọng, khoảng 5 microgam/kg thể trọng, khoảng 10 microgam/kg thể trọng, khoảng 50 microgam/kg thể trọng, khoảng 100 microgam/kg thể trọng, khoảng 200 microgam/kg thể trọng, khoảng 350 microgam/kg thể trọng, khoảng 500 microgam/kg thể trọng, khoảng 1 miligam/kg thể trọng, khoảng 5 miligam/kg thể trọng, khoảng 10 miligam/kg thể trọng, khoảng 50 miligam/kg thể trọng, khoảng 100 miligam/kg thể trọng, khoảng 200 miligam/kg thể trọng, khoảng 350 miligam/kg thể trọng, khoảng 500 miligam/kg thể trọng, đến 1000 mg/kg thể trọng hoặc lớn hơn cho một lần sử dụng, và khoảng bất kỳ trong khoảng này. Trong các ví dụ về khoảng có thể thu được mà không làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế từ các số liệu được liệt kê trong bản mô tả này, khoảng nằm trong khoảng từ 5 mg/kg thể trọng đến 100 mg/kg thể trọng, khoảng 5 microgam/kg thể trọng đến 500 miligam/kg thể trọng, v.v. có thể được sử dụng, dựa trên các số được nêu trên đây. Như vậy, một hoặc nhiều liều khoảng 0,5 mg/kg , 2,0 mg/kg , 5,0 mg/kg hoặc 10 mg/kg (hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng) có thể được sử dụng cho bệnh nhân. Các liều lượng này có thể được sử dụng gián đoạn, ví dụ hằng tuần hoặc cứ ba tuần một (ví dụ như bệnh nhân dùng từ khoảng hai đến hai mươi, hoặc ví dụ khoảng sáu liều của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T). Liều lượng nạp ban đầu cao hơn, sau đó là một hoặc nhiều liều thấp hơn có thể được sử dụng. Tuy nhiên, các chế độ liều khác có thể là hữu ích. Tiến trình của việc trị liệu này được theo dõi một cách dễ dàng bằng các kỹ thuật thông thường và thử nghiệm.

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây nhìn chung sẽ được sử dụng với lượng hữu hiệu để đạt được mục đích đã định. Để sử dụng cho điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa

tế bào T được bộc lộ ở đây, hoặc được phẩm của chúng, được dùng hoặc được áp dụng với lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu. Việc xác định lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu là đã được biết rõ trong khả năng của người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, đặc biệt là xét về phần mô tả chi tiết được đưa ra trong bản mô tả này.

Để áp dụng toàn thân, liều hữu hiệu có tác dụng trị liệu có thể được ước tính ban đầu từ thử nghiệm *in vitro*, như thử nghiệm nuôi cấy tế bào. Liều lượng sau đó có thể được phối trộn trong các mẫu động vật để đạt được khoảng nồng độ quay vòng bao gồm IC_{50} như được xác định trong môi trường nuôi cấy tế bào. Thông tin này có thể được sử dụng để xác định một cách chính xác hơn liều hữu hiệu ở người.

Các liều ban đầu cũng có thể được tính từ các số liệu *in vivo*, ví dụ, các mẫu động vật, sử dụng các kỹ thuật đã được biết rõ trong lĩnh vực. Người có trình độ trong lĩnh vực có thể đánh giá một cách dễ dàng việc sử dụng cho người dựa vào các số liệu ở động vật.

Lượng liều lượng và khoảng dùng có thể được điều chỉnh riêng để tạo ra mức độ huyết tương của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T mà đủ để duy trì tác dụng trị liệu. Liều dùng hữu ích cho bệnh nhân bằng cách tiêm nằm trong khoảng từ 0,1 đến 50 mg/kg/ngày, thường là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1 mg/kg/ngày. Mức huyết tương hữu hiệu có tác dụng trị liệu có thể đạt được bằng cách dùng nhiều liều một ngày. Mức trong huyết tương có thể được đo, ví dụ, bằng HPLC.

Trong các trường hợp dùng tại chỗ hoặc sự hấp thu có chọn lọc, hàm lượng tại chỗ hữu hiệu của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể không liên quan đến hàm lượng huyết tương. Người có trình độ trong lĩnh vực sẽ có thể xác định được liều dùng tại chỗ hữu hiệu về mặt trị liệu mà không cần thử nghiệm phức tạp.

Liều hữu hiệu có tác dụng trị liệu của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được mô tả trong bản mô tả nhìn chung sẽ tạo ra lợi ích trị liệu mà không gây ra độc tố đáng kể nào. Độc tố và hiệu quả trị liệu của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được xác định bằng quy trình thuốc tiêu chuẩn trong môi trường nuôi cấy tế bào hoặc các động vật thử nghiệm. Thử nghiệm nuôi cấy tế bào và các nghiên cứu ở động vật có thể được sử dụng để xác định LD_{50} (liều gây chết đến 50% nhóm thử nghiệm) và ED_{50} (liều hữu hiệu có tác dụng trị liệu cho 50% nhóm thử nghiệm). Tỷ lệ liều giữa độc tố và tác dụng trị liệu là chỉ số trị liệu, mà có thể được thể hiện dưới dạng tỷ lệ LD_{50}/ED_{50} . phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T là thể hiện các chỉ số trị liệu lớn là được ưu tiên. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu

kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây thể hiện chỉ số trị liệu cao. Các số liệu thu được từ thử nghiệm nuôi cấy tế bào và các nghiên cứu ở động vật có thể được sử dụng trong việc tạo công thức hàng loạt liều lượng thích hợp để sử dụng ở người. Liều lượng này tốt hơn nếu nằm trong khoảng nồng độ tuần hoàn mà gồm ED_{50} có ít hoặc không có độc tố. Liều lượng này có thể biến đổi trong khoảng này phụ thuộc vào, ví dụ, dạng liều được sử dụng, đường dùng được sử dụng, tình trạng bệnh của đối tượng, và dạng tương tự. Chế phẩm, đường dùng và liều lượng chính xác có thể được chọn bởi bác sĩ khi xem xét trình trạng bệnh của bệnh nhân (ví dụ, xem, Fingl et al., 1975, trong tài liệu: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ch. 1, p. 1).

Bác sĩ khám bệnh cho các bệnh nhân đã được xử lý bằng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây sẽ biết như thế nào và khi nào chấm dứt, ngừng, hoặc điều chỉnh việc dùng do độc tố, loạn chức năng cơ quan, và dạng tương tự. Trái lại, bác sĩ chăm sóc cũng sẽ biết điều chỉnh điều trị đến mức cao hơn nếu phản ứng lâm sàng không thích hợp (trừ bỏ độc tính). Quy mô của liều được dùng trong việc kiểm soát rối loạn được quan tâm sẽ biến đổi theo mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh được điều trị, theo đường dùng, và dạng tương tự. Mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh ví dụ, có thể được đánh giá, một phần, bằng các phương pháp đánh giá dự đoán tiêu chuẩn. Ngoài ra, liều và có thể số lần dùng liều cũng sẽ biến đổi theo độ tuổi, thể trọng và phản ứng của từng bệnh nhân.

Các tác nhân khác và điều trị

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân khác trong việc trị liệu. Ví dụ, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây có thể được đồng áp dụng với ít nhất một chất trị liệu khác. Thuật ngữ "chất trị liệu" bao gồm tác nhân bất kỳ được dùng để điều trị triệu chứng hoặc bệnh ở cá thể cần điều trị này. Chất trị liệu khác có thể bao gồm các thành phần hoạt tính bất kỳ thích hợp đối với chỉ định cụ thể được điều trị, tốt hơn nếu là các thành phần với các hoạt tính bổ sung mà không có ảnh hưởng xấu đến nhau. Theo các phương án nhất định, chất trị liệu khác là chất điều biến miễn dịch, chất kìm hãm tế bào, chất ức chế bám dính tế bào, chất gây độc tế bào, chất hoạt hóa gây chết tế bào theo chương trình, hoặc chất làm tăng độ nhạy của tế bào đối với chất kích thích gây chết tế bào theo chương trình. Theo phương án cụ thể, chất trị liệu khác là tác nhân kháng ung thư, ví dụ chất phá hủy vi ống, chất chống chuyển hoá, chất ức chế topoisomeraza, chất xen kẽ

ADN, tác nhân alkyl hóa, trị liệu hormone, chất ức chế kinase, chất đối kháng thụ thể, chất hoạt hóa gây chết tế bào khối u theo chương trình, hoặc chất kháng chống hình thành mạch.

Các tác nhân khác có mặt một cách thích hợp kết hợp với lượng mà hữu hiệu cho mục đích dự định. Lượng hữu hiệu của các tác nhân khác này phụ thuộc vào lượng của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được sử dụng, loại rối loạn hoặc điều trị, và các yếu tố khác được thảo luận ở trên. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T thông thường được sử dụng với cùng liều lượng và với các đường dùng như được nêu trong bản mô tả này, hoặc nằm trong khoảng từ 1 đến 99% liều lượng được mô tả trong bản mô tả, hoặc với lượng bất kỳ và theo đường dùng bất kỳ mà được xác định theo kinh nghiệm/theo lâm sàng là thích hợp.

Những trị liệu kết hợp này được lưu ý ở trên bao gồm việc dùng kết hợp (trong đó hai hoặc nhiều chất trị liệu được bao gồm trong cùng hợp phần hoặc các hợp phần riêng), và dùng riêng, trong trường hợp này, việc sử dụng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây có thể xuất hiện trước, đồng thời, và/hoặc sau khi dùng chất trị liệu khác và/hoặc chất phụ trợ. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây cũng có thể được sử dụng kết hợp với trị liệu bức xạ.

Vật phẩm

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất vật phẩm có chứa các nguyên liệu hữu ích để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán các rối loạn được nêu trên đây. Vật phẩm chứa thiết bị chứa và nhãn gắn hoặc hướng dẫn sử dụng lồng lên trên hoặc có liên quan đến thiết bị chứa. Thiết bị chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, các chai, lọ nhỏ, xy lanh, túi dung dịch tiêm trong tĩnh mạch, v.v. Các thiết bị chứa có thể được tạo thành từ các loại nguyên liệu như thủy tinh hoặc nhựa dẻo. Thiết bị này giữ hợp phần bởi chính thiết bị này hoặc được kết hợp với hợp phần khác hữu hiệu để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán tình trạng bệnh và có thể có cổng tiếp cận vô trùng (ví dụ thiết bị chứa có thể là túi dung dịch trong tĩnh mạch hoặc lọ nhỏ có nút chặn có thể chọc thủng bằng kim tiêm dưới da). Ít nhất một tác nhân hoạt tính trong hợp phần là phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây. Nhãn gắn hoặc hướng dẫn sử dụng thể hiện rằng hợp phần được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lựa chọn. Ngoài ra, vật phẩm có thể bao gồm (a) thiết bị chứa thứ nhất với hợp phần có chứa trong bản mô tả này, trong đó hợp phần này chứa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây; và (b) thiết bị chứa thứ hai với hợp phần có chứa trong thiết bị này, trong đó hợp phần này còn chứa chất gây độc tế bào hoặc chất trị liệu khác. Vật phẩm trong phương án này của sáng chế có thể còn bao gồm hướng

dẫn sử dụng thể hiện rằng hợp phần có thể được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh cụ thể. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, vật phẩm có thể còn bao gồm thiết bị chứa thứ hai (hoặc thứ ba) chứa chất đệm được dụng, như nước kim vi khuẩn để tiêm (BWFI), muối đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Có thể còn bao gồm các nguyên liệu khác mong muốn từ quan điểm thương mại và người sử dụng, bao gồm chất đệm khác, các chất pha loãng, thiết bị lọc, kim tiêm, và xy lanh.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây là ví dụ về các phương pháp và hợp phần được bộc lộ ở đây. Cần hiểu rằng các phương án khác nhau có thể được thực hành, phần mô tả chung được đưa ra ở trên.

Các phương pháp chung

Các kỹ thuật ADN tái tổ hợp

Các phương pháp chuẩn được sử dụng để nắn ADN như được nêu trong tài liệu: Sambrook et al., *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Các chất phản ứng sinh học phân tử được sử dụng theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Thông tin chung liên quan đến trình tự nucleotit của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch ở người được đưa ra trong tài liệu: Kabat, E.A. et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., NIH Publication No. 91-3242.

Tạo trình tự ADN

Các trình tự ADN được xác định bằng cách tạo trình tự dài kép.

Tổng hợp gen

Các đoạn gen mong muốn khi cần được tạo ra hoặc là bằng PCR sử dụng các khuôn thích hợp hoặc được tổng hợp bởi Genart AG (Regensburg, Đức) từ oligonucleotit tổng hợp và các sản phẩm PCR bằng cách tổng hợp gen tự động. Trong các trường hợp trong đó không có sẵn trình tự gen chính xác, các đoạn mỗi oligonucleotit được tạo ra dựa trên các trình tự từ các thể tương đồng gần nhất và các gen được phân lập bằng RT-PCR từ ARN có nguồn gốc từ mô thích hợp. Các đoạn gen được nằm bên sườn bởi các vị trí phân cắt endonucleaza hạn chế duy nhất được tách dòng vào vectơ tách dòng /tạo trình tự tiêu chuẩn. ADN plasmit này tinh chế từ vi khuẩn được biến đổi và hàm lượng được xác định bằng phổ UV. Trình tự ADN của các mảnh gen được tách dòng phụ được xác nhận bằng cách tạo trình tự ADN. Các đoạn

gen được tạo ra với các điểm giới hạn thích hợp cho phép tách dòng phụ thành các vector biểu hiện tương ứng. Tất cả cấu trúc được tạo ra với trình tự ADN ở đầu 5' mã hóa peptit dẫn mà nhằm tới các protein để tiết trong các tế bào có nhân điển hình. SEQ ID NO 154-162 tạo ra lần lượt các peptit dẫn minh họa và trình tự polynucleotit mã hóa chúng.

Phân lập các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người ban đầu từ các PBMC

Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (các PBMC) được điều chế bằng cách ly tâm mật độ Histopaque từ các chế phẩm lympho được làm giàu tế bào (lớp hồng cầu) thu được từ các ngân hàng máu địa phương hoặc từ máu tươi từ các thể cho là người khỏe mạnh. Một cách ngắn gọn, máu được pha loãng bằng PBS vô trùng và được tạo lớp một cách cẩn thận trên gradien Histopaque (Sigma, H8889). Sau khi ly tâm trong 30 phút ở tốc độ 4500m/s^2 ở nhiệt độ trong phòng (cái hãm được tắt đi), một phần của huyết tương ở trên PBMC có chứa pha trong được loại bỏ. Các PBMC được đưa vào ống Falcon mới dung tích 50 ml và các ống này được nạp PBS đến tổng thể tích là 50 ml. Hỗn hợp này được ly tâm ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút ở tốc độ 4000m/s^2 (cái hãm được bật lên). Dịch nổi được loại bỏ và hạt nhỏ PBMC được rửa hai lần bằng PBS vô trùng (các bước ly tâm ở nhiệt độ 4°C trong 10 phút ở tốc độ 3500m/s^2). Mật độ PBMC tạo ra được đếm tự động (ViCell) và được bảo quản trong môi trường RPMI1640, có chứa 10% FCS và 1% L-alanyl-L-glutamin (Biochrom, K0302) ở nhiệt độ 37°C , 5% CO_2 trong thiết bị ủ cho đến khi thử nghiệm bắt đầu.

Sự làm giàu tế bào T từ các PBMC được tiến hành bằng cách sử dụng bộ kit phân lập tế bào T bao gồm toàn bộ II (Pan T Cell Isolation Kit II) (Miltenyi Biotec #130-091-156), theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Một cách ngắn gọn, các lớp lắng kết tế bào được pha loãng trong 40 μl chất đệm lạnh cho 10 triệu tế bào (PBS với 0,5% BSA, 2 mM EDTA, được lọc vô trùng) và được ủ với 10 μl hỗn hợp Biotin-kháng thể cho 10 triệu tế bào trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C . Bổ sung 30 μl chất đệm lạnh và 20 μl hạt từ tính kháng biotin cho 10 triệu tế bào, và hỗn hợp này được ủ trong 15 phút nữa ở nhiệt độ 4°C . Tế bào được rửa bằng cách bổ sung 10-20x thể tích hiện tại và bước ly tâm sau đó ở tốc độ 3000m/s^2 trong 10 phút. Lên đến 100 triệu tế bào được tái tạo huyền phù trong 500 μl chất đệm. Tách từ tính của các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người chưa được gắn nhãn được tiến hành có sử dụng cột LS (Miltenyi Biotec #130-042-401) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Quần thể tế bào T tạo ra được đếm tự động (ViCell) và được bảo quản trong môi trường AIM-V ở nhiệt độ 37°C , 5% CO_2 trong thiết bị ủ cho đến khi thử nghiệm bắt đầu (không quá 24 giờ).

Phân lập tế bào T tự nhiên ban đầu ở người từ các PBMC

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (các PBMC) được điều chế bằng cách ly tâm mật độ Histopaque từ các chế phẩm lympho được làm giàu tế bào (lớp hồng cầu) thu được từ các ngân hàng máu địa phương hoặc từ máu tươi từ các thể cho là người khỏe mạnh. Việc làm giàu tế bào T từ các PBMC được tiến hành sử dụng bộ kit phân lập tế bào T dương tính với CD8 tự nhiên từ Miltenyi Biotec (#130-093-244), theo chỉ dẫn của nhà sản xuất, nhưng bỏ qua bước phân lập cuối cùng của tế bào T dương tính với CD8 (cũng xem phần mô tả để phân lập các tế bào T bao gồm toàn bộ ban đầu ở người).

Phân lập tế bào T bao gồm toàn bộ ở chuột từ các tế bào lá lách

Các lá lách được phân lập từ con chuột C57BL/6, được đưa vào ống C GentleMACS (Miltenyi Biotec #130-093-237) có chứa chất đệm MACS (PBS + 0,5% BSA + 2 mM EDTA) và được tách ra bằng thiết bị phân tách GentleMACS Dissociator để thu được các hỗn dịch tế bào đơn theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Hỗn hợp dịch tế bào được cho qua thiết bị lọc tách trước để loại bỏ các hạt mô chưa được tách ra còn lại. Sau khi ly tâm ở tốc độ 4000m/s^2 trong 4 phút ở nhiệt độ 4°C , bổ sung chất đệm phân giải ACK vào để phân giải tế bào máu đỏ (ủ trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng). Tế bào còn lại được rửa bằng chất đệm MACS hai lần, được đếm và được sử dụng để phân lập tế bào T bao gồm toàn bộ ở chuột. Sự chọn lọc âm tính (từ tính) được tiến hành sử dụng bộ kit phân lập tế bào T bao gồm toàn bộ (Pan Cell T Isolation Kit) từ Miltenyi Biotec (#130-090-861), theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Quần thể tế bào T tạo ra được đếm một cách tự động (ViCell) và được sử dụng ngay cho thử nghiệm tiếp theo.

Phân lập các PBMC ở khi ban đầu từ máu được heparin hóa

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (các PBMC) được điều chế bằng cách ly tâm mật độ từ máu tươi từ thể cho ở khi khỏe mạnh như sau: Máu được heparin hóa được pha loãng 1:3 bằng PBS vô trùng, và môi trường Lymphoprep (Axon Lab #1114545) được pha loãng đến 90% bằng PBS vô trùng. Hai thể tích của máu được pha loãng được tạo lớp trên một thể tích của gradien mật độ được pha loãng và phân đoạn PBMC được tách bằng cách ly tâm trong 30 phút ở nhiệt độ 5200m/s^2 , mà không cần hãm, ở nhiệt độ trong phòng. Dải PBMC được đưa vào ống Falcon sạch dung tích 50 ml và được rửa bằng PBS vô trùng bằng cách ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 4000m/s^2 ở nhiệt độ 4°C . Một lần ly tâm ở tốc độ thấp được tiến hành để loại bỏ các tiểu cầu (15 phút ở tốc độ 1500m/s^2 , 4°C), và quần thể PBMC tạo ra được đếm một cách tự động (ViCell) và được sử dụng ngay cho thử nghiệm tiếp theo.

Các tế bào đích

Để đánh giá phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép đích MCSP, các dòng tế bào khối u sau được sử dụng: dòng tế bào u melanin ở người WM266-4 (ATCC #CRL-1676), thu được từ điểm di căn của u hắc sắc tố ác tính và thể hiện mức cao của MCSP ở người; và dòng tế bào u melanin ở người MV-3 (loại quà tặng từ The Radboud University Nijmegen Medical Centre), biểu hiện mức độ môi trường của MCSP ở người.

Để đánh giá phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép đích CEA, các dòng tế bào khối u sau được sử dụng: dòng tế bào ung thư dạ dày ở người MKN45 (DSMZ #ACC 409), biểu hiện mức rất cao của CEA ở người; dòng tế bào caxinom tuyến ruột kết Caucasian ở nữ giới LS-174T (ECACC #87060401), biểu hiện mức độ CEA ở người từ trung bình đến thấp; dòng tế bào canxinom tuyến tụy biểu mô ở người Panc-1 (ATCC #CRL-1469), biểu hiện mức CEA ở người (rất) thấp; và dòng tế bào caxinom ruột kết ở chuột MC38-huCEA, mà được thiết kế di truyền trong nhà để biểu hiện ổn định CEA ở người.

Ngoài ra, dòng tế bào ung thư bạch cầu tế bào T ở người, Jurkat (ATCC #TIB-152), được sử dụng để đánh giá gắn kết của các cấu trúc đặc hiệu kép khác nhau đối với CD3 ở người trên tế bào.

Ví dụ 1

Điều chế, tinh chế và biệt hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép

Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được tách dòng phụ trong khung với chuỗi nặng không đổi hoặc chuỗi nhẹ không đổi được cài xen trước vào vector biểu hiện thể hiện là động vật có vú tương ứng. Kháng thể biểu hiện được dẫn bởi gen khởi đầu MPSV và trình tự tín hiệu polyA tổng hợp được nằm ở đầu 3' của CDS. Ngoài ra, mỗi vector được chứa trong trình tự EBV OriP.

Các phân tử được tạo ra bằng cách đồng chuyển nhiễm tế bào HEK293 EBNA với các vector biểu hiện ở động vật có vú. Các tế bào HEK293 EBNA phát triển theo lũy thừa đã được chuyển nhiễm bằng cách sử dụng phương pháp canxi phosphat. Theo cách khác, các tế bào HEK293 EBNA phát triển trong hỗn dịch đã được chuyển nhiễm bằng cách sử dụng polyetylenimin (PEI). Để điều chế các cấu trúc “1+1 IgG scFab, một nhánh / một nhánh đảo ngược”, tế bào được chuyển nhiễm với các vector biểu hiện tương ứng theo tỷ lệ 1:1:1 (“chuỗi nặng của vector”: “chuỗi nhẹ của vector”: “chuỗi nặng của vector-scFab”). Để điều chế các cấu trúc “2+1 IgG scFab”, tế bào được chuyển nhiễm với các vector biểu hiện tương ứng theo tỷ lệ 1:2:1 (“chuỗi nặng của vector”: “chuỗi nhẹ của vector”: “chuỗi nặng của vector-scFab”). Để điều chế các cấu trúc “1+1 IgG Crossfab”, tế bào được chuyển nhiễm với các

vector biểu hiện tương ứng theo tỷ lệ 1:1:1:1 (“chuỗi nặng thứ hai của vector”: “chuỗi nhẹ thứ nhất của vector”: “chuỗi nhẹ của vector Crossfab”: “chuỗi nặng thứ nhất của vector- Crossfab chuỗi nặng”). Để điều chế “2+1 IgG Crossfab” các cấu trúc tế bào được chuyển nhiễm với các vector biểu hiện tương ứng theo tỷ lệ 1:2:1:1 (“chuỗi nặng thứ hai của vector”: “chuỗi nhẹ của vector”: “chuỗi nặng thứ nhất của vector-chuỗi nặng Crossfab”): “chuỗi nhẹ của vector Crossfab”. Để điều chế các cấu trúc của “2+1 IgG Crossfab, chuỗi nhẹ được liên kết”, tế bào được chuyển nhiễm với các vector biểu hiện tương ứng theo tỷ lệ 1:1:1:1 (“chuỗi nặng của vector”: “chuỗi nhẹ của vector”: “chuỗi nặng của vector (CrossFab-Fab-Fc”): “chuỗi nhẹ của vector được liên kết”). Để điều chế các cấu trúc “1+1 CrossMab”, tế bào được chuyển nhiễm với các vector biểu hiện tương ứng theo tỷ lệ 1:1:1:1 (“chuỗi nặng thứ nhất của vector”: “chuỗi nặng thứ hai của vector”: “chuỗi nhẹ thứ nhất của vector”: “chuỗi nhẹ thứ hai của vector”). Để điều chế cấu trúc “dung hợp chuỗi nhẹ 1+1 IgG Crossfab”, tế bào được chuyển nhiễm với các vector biểu hiện tương ứng theo tỷ lệ 1:1:1:1 (“chuỗi nặng thứ nhất của vector”: “chuỗi nặng thứ hai của vector”: “chuỗi nhẹ của vector Crossfab”: “chuỗi nhẹ thứ hai của vector”).

Để chuyển nhiễm bằng cách sử dụng các tế bào canxi phosphat đã được phát triển như các môi trường nuôi cấy một lớp bám dính trong các bình T sử dụng môi trường nuôi cấy DMEM đã được bổ sung 10 % (thể tích/thể tích) FCS, và được chuyển nhiễm khi chúng hợp lưu nằm trong khoảng từ 50 đến 80%. Để chuyển nhiễm bình T150, 15 triệu tế bào được gieo 24 giờ trước khi chuyển nhiễm trong 25 ml môi trường nuôi cấy DMEM được bổ sung FCS (ở nồng độ cuối cùng 10% thể tích/thể tích), và tế bào được đặt ở 37°C trong thiết bị ủ với 5% môi trường CO₂ qua đêm. Đối với mỗi bình T150 cần được chuyển nhiễm, dung dịch ADN, CaCl₂ và nước được điều chế bằng cách trộn 94 µg tổng ADN của vector plasmid được chia theo tỷ lệ tương ứng, nước đến thể tích cuối cùng là 469 µl và 469 µl của dung dịch 1 M CaCl₂. Bổ sung 938 µl của 50 mM dung dịch HEPES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄ vào dung dịch này ở độ pH=7,05, trộn ngay trong 10 giây và để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 20 giây. Hỗn dịch này được pha loãng bằng 10 ml DMEM đã được bổ sung 2 % (thể tích/thể tích) FCS, và được thêm vào T150 thay cho môi trường hiện có. Sau đó, bổ sung thêm 13 ml môi trường chuyển nhiễm nữa. Các tế bào được ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong khoảng thời gian từ 17 đến 20 giờ, sau đó môi trường được thay thế bằng 25 ml DMEM, 10 % FCS. Môi trường nuôi cấy được điều hòa được thu hoạch xấp xỉ 7 ngày sau trao đổi môi trường bằng cách ly tâm trong 15 phút ở tốc độ 2100m/s², được lọc vô trùng (thiết bị lọc 0,22 µm), được bổ sung natri azit đến nồng độ cuối cùng là 0,01 % (khối lượng/thể tích), và được giữ ở nhiệt độ 4°C.

Để chuyển nhiễm bằng cách sử dụng các tế bào polyetylenimin (PEI) HEK293 EBNA được nuôi cấy trong hỗn dịch trong môi trường nuôi cấy CD CHO không có huyết thanh. Để sản xuất trong bình lắc dung tích 500ml, 400 triệu tế bào HEK293 EBNA được gieo 24 giờ trước khi chuyển nhiễm. Để chuyển nhiễm, các tế bào được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 2100m/s^2 , và dịch nổi được thay thế bằng 20 ml môi trường CD CHO được gia nhiệt trước đó. Các vector biểu hiện được trộn trong 20 ml môi trường CD CHO đến hàm lượng cuối cùng là 200 μg ADN. Sau khi bổ sung 540 μl PEI, hỗn hợp được quay tròn trong 15 giây và sau đó được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, tế bào được trộn với dung dịch ADN /PEI, được chuyển vào bình lắc dung tích 500ml và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ với 5% môi trường CO_2 . Sau thời gian ủ, bổ sung 160 ml môi trường F17 và tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Một ngày sau khi chuyển nhiễm, bổ sung 1 mM axit valproic và 7% Feed 1 (Lonza). Sau khi nuôi cấy 7 ngày, dịch nổi được thu gom để tinh chế bằng cách ly tâm trong 15 phút ở tốc độ 2100m/s^2 , dung dịch này được lọc vô trùng (thiết bị lọc $0,22\text{ }\mu\text{m}$), được bổ sung natri azit đến nồng độ cuối cùng là 0,01 % khối lượng/thể tích, và được giữ ở nhiệt độ 4°C .

Các protein được tiết được tinh chế từ các dịch nổi nuôi cấy tế bào bằng sắc ký ái lực Protein A, sau đó là bước sắc ký loại trừ theo kích cỡ.

Để sắc ký ái lực, dịch nổi được nạp lên trên cột HiTrap ProteinA HP (CV = 5 ml, GE Healthcare) được cân bằng với 25 ml 20 mM natri phosphat, 20 mM natri xitrat, độ pH = 7,5 hoặc 40 ml 20 mM natri phosphat, 20 mM natri xitrat, 0,5 M natri clorua, độ pH = 7,5. Protein chưa được bao được loại bỏ bằng cách rửa với ít nhất mười cột thể tích 20 mM natri phosphat, 20 mM natri xitrat, 0,5 M natri clorua, độ pH = 7,5, sau đó là bước rửa nữa sử dụng sáu thể tích cột 10 mM natri phosphat, 20 mM natri xitrat, 0,5 M natri clorua, độ pH = 5,45. Sau đó, cột được rửa bằng 20 ml 10 mM MES, 100 mM natri clorua, độ pH = 5,0, và protein đích được rửa giải trong sáu thể tích cột 20 mM natri xitrat, 100 mM natri clorua, 100 mM glyxin, độ pH = 3,0. Theo cách khác, protein đích được rửa giải bằng cách sử dụng gradien trong hơn 20 thể tích cột từ 20 mM natri xitrat, 0,5 M natri clorua, độ pH = 7,5 đến 20 mM natri xitrat, 0,5 M natri clorua, độ pH = 2,5. Dung dịch protein được trung hòa bằng cách bổ sung 1/10 của 0,5 M natri phosphat, độ pH = 8. Protein đích được cô và được lọc trước khi nạp lên trên cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) được cân bằng với 25 mM kali phosphat, 125 mM natri clorua, 100 mM dung dịch glyxin có độ pH = 6,7. Để tinh chế cột 1+1 IgG Crossfab được cân bằng với 20 mM histidin, 140 mM dung dịch natri clorua có độ pH 6,0.

Hàm lượng protein của các mẫu protein được tinh chế được xác định bằng cách đo mật độ quang (OD) ở 280 nm, sử dụng hệ số tắt phân tử được tính trên cơ sở của trình tự axit amin. Độ tinh khiết và phân tử lượng của các cấu trúc đặc hiệu kép được phân tích bằng SDS-PAGE với sự có mặt và không có mặt của chất khử (5 mM 1,4-dithiotreitol) và nhuộm màu với Coomassie (SimpleBlue™ SafeStain từ Invitrogen) sử dụng hệ thống gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen, USA) được sử dụng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (4-12% gel Tris-Acetate hoặc 4-12% Bis-Tris). Theo cách khác, độ tinh khiết và phân tử lượng của các phân tử được phân tích bằng cách phân tích CE-SDS với sự có mặt và không có mặt của chất khử, sử dụng hệ thống Caliper LabChip GXII (Caliper Lifescience) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Hàm lượng kết tụ của các mẫu protein được phân tích bằng cách sử dụng cột sắc ký loại theo kích cỡ phân tích Superdex 200 10/300GL (GE Healthcare) trong 2 mM MOPS, 150 mM NaCl, 0,02% (khối lượng/thể tích) NaN_3 , độ pH = 7,3, chất đệm chạy ở 25°C. Theo cách khác, hàm lượng chất kết tụ của các mẫu kháng thể được phân tích bằng cách sử dụng cột loại theo kích cỡ phân tích TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) trong 25 mM K_2HPO_4 , 125 mM NaCl, 200 mM L-arginin monohydroclorua, 0,02% (khối lượng/thể tích) NaN_3 , độ pH = 6,7 chất đệm chạy ở 25°C.

Fig. 2-Fig.14 thể hiện các kết quả của SDS PAGE và sắc ký loại trừ theo phân tích kích cỡ và Bảng 2A thể hiện hiệu suất, hàm lượng khối kết tụ sau khi Protein A, và hàm lượng monome cuối cùng của các chế phẩm của các cấu trúc đặc hiệu kép khác nhau.

Fig.47 thể hiện kết quả của các phân tích CE-SDS của cấu trúc “2+1 IgG Crossfab, chuỗi nhẹ được liên kết” đặc hiệu kép cấu trúc kháng-CD3/kháng-MCSP (xem SEQ ID NO 3, 5, 29 và 179). 2 μg mẫu được sử dụng để phân tích. Fig.48 thể hiện kết quả của sắc ký loại trừ theo phân tích kích cỡ của sản phẩm sau cùng (20 μg mẫu được tiêm).

Fig.54 thể hiện các kết quả của các phân tích CE-SDS và SDS PAGE của các cấu trúc khác nhau, và Bảng 2A thể hiện hiệu suất, hàm lượng khối kết tụ sau hàm lượng Protein A và hàm lượng monome cuối cùng của các chế phẩm của các cấu trúc đặc hiệu kép khác nhau.

BẢNG 2A. Hiệu suất, hàm lượng khối kết tụ sau hàm lượng Protein A và hàm lượng Monome cuối cùng

Cấu trúc	Hiệu suất	Hàm lượng khối kết tụ sau	Phân tử	Phân tử	Monome [%]
----------	-----------	---------------------------	---------	---------	------------

	[mg/l]	Protein A [%]	lượng cao [%]	lượng thấp [%]	
MCSP					
2+1 IgG Crossfab; chuyển đổi VH/VL (LC007/V9) (SEQ ID NO 3, 5, 29, 33)	12,8	2,2	0	0	100
2+1 IgG Crossfab; chuyển đổi VH/VL (LC007/FN18) (SEQ ID NO 3, 5, 35, 37)	3,2	5,7	0,4	0	99,6
2+1 IgG scFab, P329G LALA (SEQ ID NO 5, 21, 23)	11,9	23	0,3	0	99,7
2+1 IgG scFab, LALA (SEQ ID NO 5, 17, 19)	9	23	0	0	100
2+1 IgG scFab, P329G LALA N297D (SEQ ID NO 5, 25, 27)	12,9	32,7	0	0	100
2+1 IgG scFab, wt (SEQ ID NO 5, 13, 15)	15,5	31,8	0	0	100
1+1 IgG scFab (SEQ ID NO 5, 21, 213)	7	24,5	0	0	100
1+1 IgG scFab “một nhánh” (SEQ ID NO 1, 3, 5)	7,6	43,7	2,3	0	97,7
1+1 IgG scFab “một nhánh đảo ngược” (SEQ ID NO 7, 9, 11)	1	27	7,1	9,1	83,8
1+1 IgG Crossfab; chuyển đổi VH/VL (LC007/V9) (SEQ ID NO 5, 29, 31, 33)	9,8	0	0	0	100

2+1 IgG Crossfab, chuỗi nhẹ được liên kết; chuyển đổi VL/VH (LC007/V9) (SEQ ID NO 3, 5, 29, 179)	0,54	40	1,4	0	98,6
1+1 IgG Crossfab; chuyển đổi VL/VH (LC007/V9) (SEQ ID NO 5, 29, 33, 181)	6,61	8,5	0	0	100
1+1 CrossMab; chuyển đổi CL/CH1 (LC00/V9) (SEQ ID NO 5, 23, 183, 185)	6,91	10,5	1,3	1,7	97
2+1 IgG Crossfab, đảo ngược; chuyển đổi CL/CH1 (LC007/V9) (SEQ ID NO 5, 23, 183, 187)	9,45	6,1	0,8	0	99,2
2+1 IgG Crossfab; chuyển đổi VL/VH (M4-3 ML2/V9) (SEQ ID NO 33, 189, 191, 193)	36,6	0	9,5	35,3	55,2
2+1 IgG Crossfab; chuyển đổi CL/CH1 (M4-3 ML2/V9) (SEQ ID NO 183, 189, 193, 195)	2,62	12	2,8	0	97,2
2+1 IgG Crossfab; chuyển đổi CL/CH1 (M4-3 ML2/H2C) (SEQ ID NO 189, 193, 199, 201)	29,75	0	0	0	100
2+1 IgG Crossfab; chuyển đổi CL/CH1 (LC007/kháng-CD3) (SEQ ID NO 5, 23, 215, 217)	1,2	0	1,25	1,65	97,1
2+1 IgG Crossfab, đảo ngược; chuyển đổi CL/CH1 (LC007/kháng-CD3)	7,82	0,5	0	0	100

(SEQ ID NO 5, 23, 215, 219)					
EGFR					
2+1 IgG scFab (SEQ ID NO 45, 47, 53)	5,2	53	0	30	70
1+1 IgG scFab (SEQ ID NO 47, 53, 213)	3,4	66,6	0	1,6	98,4
1+1 IgG scFab “một nhánh” (SEQ ID NO 43, 45, 47)	9,05	60,8	0	0	100
1+1 IgG scFab “một nhánh đảo ngược” (SEQ ID NO 11, 49, 51)	3,87	58,8	0	0	100
FAP					
2+1 IgG scFab (SEQ ID NO 57, 59, 61)	12,57	53	0	0	100
1+1 IgG scFab (SEQ ID NO 57, 61, 213)	17,95	41	0,4	0	99,6
1+1 IgG scFab “một nhánh đảo ngược” (SEQ ID NO 11, 51, 55)	2,44	69	0,6	0	99,4
CEA					
2+1 IgG Crossfab, đảo ngược; chuyển đổi VL/VH (CH1A1A/V9) (SEQ ID NO 33, 63, 65, 67)	0,34	13	4,4	0	95,6
2+1 IgG Crossfab, đảo ngược; chuyển đổi CL/CH1 (CH1A1A/V9) (SEQ ID NO 65, 67, 183, 197)	12,7	43	0	0	100

2+1 IgG Crossfab, đảo ngược; chuyển đổi CL/CH1 (431/26/V9) (SEQ ID NO 183, 203, 205, 207)	7,1	20	0	0	100
1+1 IgG-Crossfab dung hợp chuỗi nhẹ (CH1A1A/V9) (SEQ ID NO 183, 209, 211, 213)	7,85	27	4,3	3,2	92,5

Để làm đối chứng, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép được tạo ra theo kiểu scFv sau đã biết trong tình trạng kỹ thuật (" $(scFv)_2$ ") và bằng cách dung hợp scFv sau với miền Fc (" $(scFv)_2$ -Fc"). Các phân tử được tạo ra ở tế bào HEK293-EBNA và được tinh chế bằng sắc ký ái lực Protein A sau đó là bước sắc ký loại trừ theo kích cỡ theo cách tương tự như được nêu trên. Do sự hình thành khối kết tụ cao, một số mẫu cần được tinh chế thêm bằng cách áp dụng các mẫu được rửa giải và được cô đặc từ cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) cho cột Superdex 10/300 GL (GE Healthcare) được cân bằng với 20 mM histidin, 140 mM natri clorua, độ pH = 6,7 để thu được protein với hàm lượng monome cao. Sau đó, hàm lượng protein, độ tinh khiết và phân tử lượng, và hàm lượng khối kết tụ được xác định như được nêu trên.

Hiệu suất, hàm lượng khối kết tụ sau bước tinh chế đầu tiên, và hàm lượng monome cuối cùng cho các phân tử đối chứng được thể hiện trong Bảng 2B. So sánh hàm lượng khối kết tụ sau bước tinh chế đầu tiên (Protein A) chỉ ra độ ổn định tốt hơn của các cấu trúc IgG Crossfab và IgG scFab so với " $(scFv)_2$ -Fc" và các phân tử " $(dsscFv)_2$ -Fc" được ổn định cầu disulfua.

BẢNG 2B. Hiệu suất, hàm lượng khối kết tụ sau hàm lượng Protein A và hàm lượng monome cuối cùng

Cấu trúc	Hiệu suất [mg/l]	Khối kết tụ sau Protein A [%]	Cuối cùng		
			Phân tử lượng cao [%]	Phân tử lượng thấp [%]	Monome [%]

(scFv) ₂ -Fc (kháng MCSP/kháng huCD3)	76,5	40	0,5	0	99,5
(dsscFv) ₂ -Fc (khángMCSP/kháng huCD3)	2,65	48	7,3	8,0	84,7

Độ ổn định nhiệt của các protein được theo dõi bằng cách phân tán ánh sáng động (DLS). 30.g mẫu protein được lọc với hàm lượng protein của 1 mg/ml được áp dụng vào hai phiên bản đối với thiết bị đọc đĩa Dynapro (Wyatt Technology Corporation; USA). Nhiệt độ được biến đổi từ 25 đến 75°C ở 0,05°C/phút, với bán kính và tổng mật độ phân tán được thu gom. Các kết quả được thể hiện trên Fig.15 và Bảng 2C. Đối với hai điểm ngưng tụ phân tử “(scFv)₂-Fc” (kháng MCSP/kháng huCD3) được quan sát, ở 49°C và 68°C. Cấu trúc “(dsscFv)₂-Fc” có nhiệt độ ngưng tụ tăng (57°C) do cầu disulfua được đưa vào (Fig.15A, Bảng 2C). Cả hai cấu trúc “2+1 IgG scFab” và “2+1 IgG Crossfab” kết tụ ở những nhiệt độ cao hơn 60°C, chứng tỏ độ ổn định nhiệt tốt hơn của chúng khi so với so với các dạng “(scFv)₂-Fc” và “(dsscFv)₂-Fc” (Fig.15B, Bảng 2C).

BẢNG 2C. Độ ổn định nhiệt được xác định bằng phân tán ánh sáng động.

Cấu trúc	T _{agg} [°C]
2+1 IgG scFab (LC007/V9)	68
2+1 IgG Crossfab (LC007/V9)	65
Fc-(scFv) ₂ (LC007/V9)	49/68
Fc-(dsscFv) ₂ (LC007/V9)	57

Ví dụ 2

Phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt của thụ thể Fc và liên kết kháng nguyên đích

Phương pháp

Tất cả các thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) được tiến hành trên Biacore T100 ở nhiệt độ 25°C với HBS-EP làm chất đệm chạy (0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% chất hoạt động bề mặt P20, Biacore, Freiburg/Đức).

Phân tích liên kết FcR của các biến thể Fc khác nhau

Thử nghiệm được thiết lập được thể hiện trên Fig.16A. Để phân tích sự tương tác của các biến thể Fc khác nhau với liên hợp trực tiếp FcγRIIIa-V158 ở người và FcγRIV ở chuột của khoảng 6.500 đơn vị cộng hưởng (RU) của kháng thể kháng-Penta His (Qiagen) được tiến hành trên mảnh CM5 ở độ pH = 5,0, sử dụng bộ kit kết hợp amin tiêu chuẩn (Biacore, Freiburg/Đức). HuFcγRIIIa-V158-K6H6 và muFcγRIV-aviHis-biotin được giữ trong 60 giây lần lượt ở 4 và 10 nM.

Các cấu trúc với sự đột biến Fc khác nhau được cho qua tế bào chảy trong 120 giây ở hàm lượng là 1000 nM với tốc độ chảy là 30 μl/phút. Sự phân ly được theo dõi trong 220 giây. Sự khác biệt chỉ số khúc xạ thể tích được hiệu chỉnh đối với bằng cách trừ đi đáp ứng thu được trong tế bào chảy tham chiếu. Trong bản mô tả này, các biến thể Fc được chảy qua bề mặt với cố định kháng thể kháng-Penta His nhưng trên đó HBS-EP đã được bơm hơn là HuFcγRIIIa-V158-K6H6 hoặc muFcγRIV-aviHis-biotin. Ái lực đối với FcγRIIIa-V158 ở người và FcγRIV ở chuột đã được xác định đối với Fc kiểu đại bằng cách sử dụng hàm lượng nằm trong khoảng từ 500 – 4000 nM.

Phản ứng trạng thái ổn định được sử dụng để thu được hằng số phân ly K_D bằng cách điều chỉnh đường cong không tuyến tính của đường đẳng nhiệt liên kết Langmuir. Hằng số động học thu được bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T100 (vAA, Biacore AB, Uppsala/Thụy Điển), để khớp phương trình tốc độ đối với 1:1 liên kết Langmuir bằng cách phân tích số.

Kết quả

Sự tương tác giữa các biến thể Fc với FcγRIIIa ở người và FcγRIV ở chuột được theo dõi bằng cộng hưởng plasmon bề mặt. Gắn kết với huFcγRIIIa-V158-K6H6 được giữ và muFcγRIV-aviHis-biotin được giảm xuống một cách đáng kể đối với tất cả các thể đột biến Fc được phân tích so với cấu trúc với miền Fc (wt) kiểu đại.

Các thể đột biến Fc có liên kết thấp nhất với thụ thể Fcγ ở người là P329G L234A L235A (LALA) và P329G LALA N297D. Sự đột biến LALA một mình không đủ để phá bỏ gắn kết với huFcγRIIIa-V158-K6H6. Biến thể Fc chỉ có sự đột biến LALA có ái lực liên kết dư với FcγRIIIa ở người là 2,100 nM, trong khi wt Fc gắn kết thụ thể FcγRIIIa ở người với ái lực là 600 nM (Bảng 3). Cả hai trị số K_D nhận được bằng mô hình liên kết 1:1, sử dụng hàm lượng đơn.

Ái lực với FcγRIIIa-V158 ở người và FcγRIV ở chuột chỉ có thể được phân tích đối với khối lượng Fc. Các trị số K_D được liệt kê trong Bảng 3. Gắn kết với FcγRIV ở chuột hầu như được loại bỏ hoàn toàn đối với tất cả các thể đột biến Fc được phân tích.

BẢNG 3. Ái lực của các biến thể Fc với FcγRIIIa-V158 ở người và FcγRIV ở chuột.

K_D theo nM T = 25°C	FcγRIIIa-V158 ở người		FcγRIV ở chuột	
	động học	trạng thái ổn định	động học	trạng thái ổn định
Khối lượng Fc (SEQ ID NO 5, 13, 15)	600* (1200)	3470	576	1500
Fc-LALA (SEQ ID NO 5, 17, 19)	2130*	không xác định	không xác định	
Fc-P329G LALA (SEQ ID NO 5, 21, 23)	không xác định		không xác định	
Fc-P329G LALA N297D (SEQ ID NO 5, 25, 27)	không xác định		không xác định	

*được xác định bằng cách sử dụng một hàm lượng (1000 nM)

Phân tích gắn kết đồng thời với kháng nguyên khối u và CD3

Việc phân tích gắn kết đồng thời của các cấu trúc đặc hiệu kép tế bào T với kháng nguyên khối u và CD3ε ở người được thực hiện bằng cách kết hợp trực tiếp 1650 đơn vị cộng hưởng (RU) của miền D3 được biotinyl hóa của MCSP trên mạch cảm biến SA bằng cách sử dụng quy trình kết hợp tiêu chuẩn. EGFR ở người được giữ cố định bằng cách sử dụng quy trình ghép amino tiêu chuẩn. 8000 RU được giữ cố định trên mạch cảm biến CM5 ở độ pH=5,5. Thiết lập thử nghiệm được thể hiện trên Fig.16B.

Các cấu trúc đặc hiệu kép tế bào T khác nhau được giữ trong 60 giây ở 200 nM. CD3γ(G₄S)₅CD3ε–AcTev–Fc(phần phình)–Avi/Fc(phần lõm) ở người sau đó được chuyển qua hàm lượng là 2000 nM và tốc độ chảy là 40 μl/phút trong 60 giây. Sự khác biệt chỉ số khúc xạ thể tích được điều chỉnh bằng cách trừ đi đáp ứng thu được trên tế bào chảy tham

chiều trong đó CD3ε tái tổ hợp được chảy trên bề mặt với miền D3 cố định của MCSP hoặc EGFR mà không có cấu trúc đặc hiệu kép tế bào T được giữ.

Kết quả

Gắn kết đồng thời với cả kháng nguyên khối u và CD3ε ở người được phân tích bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (Fig.17, Fig.18). Tất cả các cấu trúc có khả năng gắn kết với kháng nguyên khối u và CD3 đồng thời. Đối với hầu hết mức cấu trúc liên kết (RU) sau khi bơm CD3ε ở người là cao hơn mức liên kết đạt được sau khi bơm một mình cấu trúc phản ánh rằng cả kháng nguyên khối u và CD3ε ở người được gắn kết với cấu trúc.

Ví dụ 3

Gắn kết của các cấu trúc đặc hiệu kép với kháng nguyên đích tương ứng trên tế bào

Gắn kết của các cấu trúc đặc hiệu kép khác nhau với CD3 trên các tế bào Jurkat (ATCC #TIB-152), và kháng nguyên khối u tương ứng trên các tế bào đích, được xác định bằng FACS. Một cách ngắn gọn, tế bào được thu gom, được đếm và được kiểm tra về khả năng sống được. 0,15 – 0,2 triệu tế bào cho mỗi lỗ (trong PBS có chứa 0,1% BSA; 90 µl) được cấy đĩa trong đĩa đáy tròn có 96 lỗ và được ủ hàm lượng đã định của các cấu trúc đặc hiệu kép và các đối chứng IgG tương ứng (10 µl) trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Để so sánh tốt hơn, tất cả cấu trúc và các đối chứng IgG được bình thường hóa đến cùng nồng độ phân tử gam. Sau khi ủ, tế bào được ly tâm (5 phút, 3500m/s²), được rửa bằng 150 µl PBS có chứa 0,1% BSA, được tái tạo huyền phù và được ủ trong 30 phút nữa ở nhiệt độ 4°C với 12 µl/lỗ của kháng thể thứ cấp được liên hợp với FITC hoặc PE. Các cấu trúc được liên kết được phát hiện bằng cách sử dụng FACSCantoII (phần mềm FACS Diva). Phân tử “(scFv)₂” được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng-His được liên hợp với FITC (Lucerna, #RHIS-45F-Z). Đối với tất cả phân tử khác, mảnh AffiniPure F(ab')₂ được liên hợp với FITC hoặc PE, mảnh đặc hiệu IgG Fcγ ở dê kháng người (Jackson Immuno Research Lab # 109-096-098 / dung dịch xử lý 1:20, hoặc #109-116-170 / dung dịch xử lý 1:80, một cách tương ứng) được sử dụng. Tế bào được rửa bằng cách bổ sung 120 µl/lỗ PBS có chứa 0,1% BSA và ly tâm ở tốc độ 3500 m/s² trong 5 phút. Bước rửa thứ hai được tiến hành với 150 µl/lỗ PBS có chứa 0,1% BSA. Trừ khi có quy định khác, các tế bào được cố định bằng 100 µl/lỗ chất đệm cố định (BD #554655) for 15 phút ở nhiệt độ 4°C ở chỗ tối, được ly tâm trong 6 phút ở tốc độ 4000m/s² và được giữ trong 200 µl/lỗ PBS có chứa 0,1% BSA cho đến khi các mẫu được xác định với FACS CantoII. Các trị số EC50 được tính bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism.

Trong thử nghiệm thứ nhất, các cấu trúc đặc hiệu kép khác nhau tạo đích MCSP ở người và CD3 ở người được phân tích bằng bào kế chảy để gắn kết với CD3 ở người được biểu hiện trên Jurkat, tế bào bệnh bạch cầu tế bào T ở người, hoặc đối với MCSP ở người trên tế bào u melanin Colo-38 ở người.

Các kết quả được trình bày trên Fig.19-Fig.21, thể hiện cường độ phát quang trung bình của tế bào mà đã được ủ với phân tử đặc hiệu kép, IgG đối chứng, chỉ kháng thể thứ cấp, hoặc được xử lý bên trái.

Như được thể hiện trên Fig.19, đối với cả hai gốc gắn kết kháng nguyên của phân tử “(scFv)₂”, tức là, CD3 (Fig.191A) và MCSP (Fig.19B), tín hiệu liên kết rõ được quan sát so với các mẫu đối chứng.

Phân tử “2+1 IgG scFab” (SEQ ID NO 5, 17, 19) thể hiện liên kết tốt với huMCSP trên tế bào Colo-38 (Fig.20A). Gốc CD3 liên kết CD3 tốt hơn một cách không đáng kể so với IgG của CD3 kháng người tham khảo (Fig.20B).

Như được biểu thị trên Fig.21A, hai cấu trúc “1+1” thể hiện các tín hiệu liên kết có thể so sánh được đối với CD3 ở người trên tế bào. IgG của CD3 kháng người tham khảo tạo ra tín hiệu yếu hơn một cách không đáng kể. Ngoài ra, cả hai cấu trúc được thử nghiệm (“1+1 IgG scFab, một nhánh” (SEQ ID NO 1, 3, 5) và “1+1 IgG scFab, một nhánh đảo ngược” (SEQ ID NO 7, 9, 11)) thể hiện liên kết có thể so sánh được với MCSP ở người trên tế bào (Fig.21B). Tín hiệu liên kết thu được với IgG của MCSP kháng người tham khảo yếu hơn không đáng kể.

Theo thử nghiệm khác nữa, cấu trúc đặc hiệu kép “2+1 IgG scFab” được tinh chế (SEQ ID NO 5, 17, 19) và IgG của MCSP kháng người tương ứng được phân tích bằng bào kế chảy đối với gắn kết phụ thuộc vào liều lượng với MCSP ở người trên tế bào u melanin Colo-38 ở người, để xác định xem là cấu trúc đặc hiệu kép gắn kết với MCSP thông qua một hay cả hai “nhánh” của nó. Như được biểu thị trên Fig.22, cấu trúc “2+1 IgG scFab” thể hiện kiểu liên kết giống như IgG của MCSP.

Theo thử nghiệm khác nữa, gắn kết của các cấu trúc đặc hiệu kép CD3/CEA “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược” với VL/VH (xem SEQ ID NO 33, 63, 65, 67) hoặc sự chuyển đổi CL/CH1 (xem SEQ ID NO 66, 67, 183, 197) trong mảnh Crossfab đối với CD3 ở người, được biểu hiện bằng các tế bào Jurkat, hoặc với CEA ở người, được biểu hiện bằng các tế bào LS-174T, được đánh giá. Để làm đối chứng, hàm lượng tối đa tương đương của các IgG tương ứng và nhuộm màu nền do kháng thể thứ hai được gắn nhãn (mảnh AffiniPure F(ab')₂

được liên hợp với FITC ở dê kháng người, mảnh đặc hiệu Fc γ , Jackson Immuno Research Lab # 109-096-098) cũng được đánh giá như vậy. Như được minh họa trên Fig.55, cả hai cấu trúc thể hiện liên kết tốt với CEA ở người, cũng như đối với CD3 ở người trên tế bào. Các trị số EC50 được tính lần lượt là 4,6 và 3,9 nM (CD3), và 9,3 và 6,7 nM (CEA) đối với các cấu trúc “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược (VL/VH)” và “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược (CL/CH1)”.

Theo thử nghiệm khác nữa, gắn kết của các cấu trúc CD3/MCSP “2+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33) và “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược” (xem SEQ ID NO 5, 23, 183, 187) đối với CD3 ở người, được biểu hiện bằng các tế bào Jurkat, hoặc với MCSP ở người, được biểu hiện bằng tế bào WM266-4, được đánh giá. Fig.56 thể hiện rằng trong khi gắn kết của cả hai cấu trúc với MCSP trên tế bào có lợi ích đáng kể, gắn kết của cấu trúc “đảo ngược” với CD3 giảm xuống so với cấu trúc khác. Các trị số EC50 được tính lần lượt là 6,1 và 1,66 nM (CD3), và 0,57 và 0,95 nM (MCSP) đối với các cấu trúc “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược” và “2+1 IgG Crossfab”.

Trong thử nghiệm khác, gắn kết của cấu trúc “thể dung hợp chuỗi nhẹ (LC) 1+1 IgG Crossfab” (SEQ ID NO 183, 209, 211, 213) đối với CD3 ở người, được biểu hiện bằng các tế bào Jurkat, và với CEA ở người, được biểu hiện bằng các tế bào LS-174T đã được xác định. Để làm đối chứng, hàm lượng tối đa tương đương của các IgG kháng-CD3 và kháng-CEA tương ứng và nhuộm màu nền do kháng thể thứ hai được gắn nhãn (mảnh AffiniPure F(ab')₂ được liên hợp với FITC ở dê kháng người, mảnh đặc hiệu Fc γ , Jackson Immuno Research Lab #109-096-098) cũng được đánh giá như vậy. Như được biểu thị trên Fig.57, gắn kết của “thể dung hợp 1+1 IgG Crossfab LC” với CEA dường như là giảm đáng kể, trong đó gắn kết với CD3 ít nhất có thể so sánh với IgG tham khảo.

Trong thử nghiệm cuối cùng, gắn kết của các cấu trúc “2+1 IgG Crossfab” (SEQ ID NO 5, 23, 215, 217) và “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược” (SEQ ID NO 5, 23, 215, 219) đối với CD3 ở người, được biểu hiện bằng các tế bào Jurkat, và với MCSP ở người, được biểu hiện bằng tế bào khối u WM266-4 đã được xác định. Như được biểu thị trên Fig.58 gắn kết với CD3 ở người được giảm xuống đối với “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược” so với cấu trúc khác, nhưng gắn kết với MCSP ở người có giá trị đáng kể. Các trị số EC50 được tính lần lượt bằng 10,3 và 32,0 nM (CD3), và 3,1 và 3,4 nM (MCSP) đối với cấu trúc “2+1 IgG Crossfab” và “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược”.

Ví dụ 4

Phân tích FACS của các gen đánh dấu hoạt hóa bề mặt trên
tế bào T ban đầu ở người khi gắn kết các cấu trúc đặc hiệu kép

“2+1 IgG scFab” đặc hiệu kép đích huMCSP-huCD3 được tinh chế (SEQ ID NO 5, 17, 19) và các phân tử “(scFv)₂” được kiểm tra bằng bào kế chảy về khả năng của chúng để điều tiết tăng gen đánh dấu hoạt hóa bề mặt sớm CD69, hoặc gen đánh dấu hoạt hóa muộn CD25 trên tế bào T dương tính với CD8 với sự có mặt của tế bào khối u biểu hiện MCSP ở người.

Một cách ngắn gọn, tế bào Colo-38 dương tính với MCSP được thu gom với chất đệm phân ly tế bào, được đếm và được kiểm tra về khả năng sống được. Tế bào được điều chỉnh đến tế bào $0,3 \times 10^6$ (có thể sống sót) cho một ml trong môi trường AIM-V, 100 μ l của hỗn dịch tế bào này cho mỗi lỗ được đưa bằng pipet vào trong đĩa đáy tròn 96 lỗ (như được chỉ ra). Bổ sung 50 μ l cấu trúc đặc hiệu kép (được pha loãng) vào các lỗ chứa tế bào thu được nồng độ cuối cùng là 1 nM. Tế bào tác động PBMC ở người được phân lập từ máu tươi của thể cho khỏe mạnh và được điều chỉnh đến tế bào 6×10^6 (có thể sống sót) cho một ml trong môi trường AIM-V. Bổ sung 50 μ l hỗn dịch tế bào này vào mỗi lỗ của đĩa thử nghiệm (xem ở trên) thu được tỷ lệ E:T cuối cùng là 10:1. Để phân tích xem là các cấu trúc đặc hiệu kép có thể hoạt hóa tế bào T duy nhất với sự có mặt của các tế bào đích biểu hiện huMCSP kháng nguyên khối u, các lỗ được bao gồm chứa 1 nM phân tử đặc hiệu kép tương ứng, cũng như các PBMC, nhưng không phải các tế bào đích.

Sau khi ủ trong 15 giờ (CD69), hoặc 24 giờ (CD25) ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂, tế bào được ly tâm (5 phút, 3500m/s²) và được rửa hai lần bằng 150 μ l/lỗ PBS chứa 0,1% BSA. Nhuộm bề mặt đối với CD8 (IgG1, κ ở chuột; dòng HIT8a; BD #555635), CD69 (IgG1 ở chuột; dòng L78; BD #340560) và CD25 (IgG1, κ ở chuột; dòng M-A251; BD #555434) được tiến hành ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút, theo gợi ý của nhà cung cấp. Tế bào được rửa hai lần bằng 150 μ l/lỗ PBS chứa 0,1% BSA và được cố định trong 15 phút ở nhiệt độ 4°C, sử dụng 100 μ l/lỗ chất đệm cố định (BD #554655). Sau khi ly tâm, các mẫu được tái tạo huyền phù trong 200 μ l/lỗ PBS với 0,1% BSA và được phân tích bằng cách sử dụng máy FACS CantoII (phần mềm FACS Diva).

Fig.23 biểu thị mức biểu hiện của gen đánh dấu hoạt hóa sớm CD69 (A), hoặc gen đánh dấu hoạt hóa muộn CD25 (B) trên tế bào T dương tính với CD8 sau lần lượt 15 giờ hoặc 24 giờ ủ. Cả hai cấu trúc đều kích thích sự điều tiết tăng của cả hai gen đánh dấu hoạt

hóa trừ sự có mặt của mặt các tế bào đích. Phân tử “(scFv)₂” dường như là có hoạt tính hơn một chút trong thử nghiệm này so với cấu trúc “2+1 IgG scFab”.

“2+1 IgG scFab” đặc hiệu kép đích huMCSP-huCD3 được tinh chế và các phân tử “(scFv)₂” được thử nghiệm thêm bằng bào kế chảy về khả năng của chúng để điều tiết tăng gen đánh dấu hoạt hóa muộn CD25 trên tế bào T dương tính với CD8 hoặc tế bào T dương tính với CD4 với sự có mặt của tế bào khối u biểu hiện MCSP ở người. Các quy trình thử nghiệm là như được nêu trên, sử dụng tế bào tác động T bao gồm toàn bộ ở người theo tỷ lệ E:T bằng 5:1 và thời gian ủ là năm ngày.

Fig.24 thể hiện cả hai cấu trúc đều kích thích sự điều tiết tăng của CD25 không kể với sự có mặt của mặt các tế bào đích trên cả hai cấu trúc này, tế bào T dương tính với CD8 (A) cũng như dương tính với CD4 (B). Cấu trúc “2+1 IgG scFab” dường như kích thích sự điều tiết tăng ít hơn của CD25 trong thử nghiệm này, so với phân tử “(scFv)₂”. Nhìn chung, sự điều tiết tăng của CD25 là rõ rệt hơn trên tế bào T dương tính với CD8 so với trên tế bào T dương tính với CD4.

Theo thử nghiệm khác nữa, CD3 ở khi tạo đích “2+1 IgG Crossfab” được tinh chế và MCSP ở người (SEQ ID NO 3, 5, 35, 37) được phân tích về khả năng của nó để điều tiết tăng gen đánh dấu hoạt hóa bề mặt CD25 trên tế bào T dương tính với CD8 với sự có mặt của các tế bào đích khối u. Một cách ngắn gọn, các tế bào đích khối u MV-3 biểu hiện MCSP ở người được thu gom với chất đệm phân ly tế bào, được rửa và được tái tạo huyền phù trong DMEM có chứa 2% FCS và 1% GlutaMax. 30 000 tế bào cho mỗi lỗ được cấy đĩa trong đĩa đáy tròn có 96 lỗ và bổ sung chất pha loãng kháng thể tương ứng vào ở các hàm lượng đã chỉ ra (Fig.25). Cấu trúc đặc hiệu kép và các đối chứng IgG khác nhau được điều chỉnh đến cùng nồng độ phân tử gam. Bổ sung tế bào tác động PBMC ở khi, được phân lập từ máu của hai động vật khỏe mạnh, thu được tỷ lệ E:T cuối cùng bằng 3:1. Sau khi ủ trong 43 giờ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂, các tế bào được ly tâm ở tốc độ 3500m/s² trong 5 phút và được rửa hai lần bằng PBS, chứa 0,1% BSA. Nhuộm bề mặt đối với CD8 (Miltenyi Biotech #130-080-601) và CD25 (BD #557138) được tiến hành theo gợi ý của nhà cung cấp. Tế bào được rửa hai lần bằng 150 µl/lỗ PBS chứa 0,1% BSA và được cố định trong 15 phút ở nhiệt độ 4°C, sử dụng 100 µl/lỗ chất đệm cố định (BD #554655). Sau khi ly tâm, các mẫu được tái tạo huyền phù trong 200 µl/lỗ PBS với 0,1% BSA và được phân tích bằng cách sử dụng máy FACS CantoII (phần mềm FACS Diva).

Như được biểu thị trên Fig.25, cấu trúc đặc hiệu kép kích thích sự điều tiết tăng phụ thuộc vào hàm lượng của CD25 trên tế bào T dương tính với CD8 chỉ với sự có mặt của các

tế bào đích. Kháng cyno IgG của CD3 (dòng FN-18) cũng có khả năng để kích thích sự điều tiết tăng của CD25 trên tế bào T dương tính với CD8, không được liên kết chéo (xem các số liệu thu được với cyno Nestor). Không có sự siêu hoạt hóa của các tế bào cyno T với hàm lượng tối đa của cấu trúc đặc hiệu kép (khi không có mặt của các tế bào đích).

Theo thử nghiệm khác nữa, CD3-MCSP “2+1 IgG Crossfab, chuỗi nhẹ được liên kết” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 179) so với CD3-MCSP “2+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33) về tiềm năng của nó để điều tiết tăng gen đánh dấu hoạt hóa sớm CD69 hoặc gen đánh dấu hoạt hóa muộn CD25 trên tế bào T dương tính với CD8 với sự có mặt của các tế bào đích khối u. Các PBMC ban đầu ở người (được phân lập như được nêu trên) được ủ với các hàm lượng đã chỉ ra của các cấu trúc đặc hiệu kép trong ít nhất 22 giờ với sự có mặt hoặc không có mặt của các tế bào đích Colo38 dương tính với MCSP. Một cách ngắn gọn, 0,3 triệu PBMC ban đầu ở người được cấy đĩa cho mỗi lỗ của đĩa có 96 lỗ đáy phẳng, chứa các tế bào đích dương tính với MCSP (hoặc môi trường). Tỷ lệ chất tác động cuối cùng với tế bào đích (E:T) là 10:1. Các tế bào được ủ với hàm lượng đã định của các cấu trúc đặc hiệu kép và các đối chứng trong thời gian ủ đã chỉ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂. Tế bào tác động được nhuộm màu đối với CD8, và CD69 hoặc CD25 và được phân tích bằng FACS CantoII.

Fig.53 thể hiện kết quả của thử nghiệm này. Không có sự khác biệt đáng kể được phát hiện đối với sự điều tiết tăng CD69 (A) hoặc CD25 (B) giữa hai phân tử 2+1 IgG Crossfab (có hoặc không có chuỗi nhẹ được liên kết).

Theo thử nghiệm khác nữa, các cấu trúc CD3/MCSP “2+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33) và “1+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 5, 29, 33, 181) được so sánh với cấu trúc “1+1 CrossMab” (xem SEQ ID NO 5, 23, 183, 185) về khả năng của chúng để điều tiết tăng CD69 hoặc CD25 trên tế bào T dương tính với CD4 hoặc tế bào T dương tính với CD8 với sự có mặt của các tế bào đích khối u. Thử nghiệm được tiến hành như được nêu trên, với sự có mặt hoặc không có mặt của MCSP ở người biểu hiện tế bào khối u MV-3, với thời gian ủ là 24 giờ.

Như được thể hiện trên Fig.59, các cấu trúc “1+1 IgG Crossfab” và “2+1 IgG Crossfab” kích thích điều tiết tăng hơn đáng kể của các gen đánh dấu hoạt hóa so với phân tử “1+1 CrossMab”.

Trong thử nghiệm cuối cùng, các cấu trúc CD3/MCSP “2+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 5, 23, 215, 217) và “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược” (xem SEQ ID NO 5, 23, 215, 219) được đánh giá về khả năng của chúng để điều tiết tăng CD25 trên tế bào T dương tính với

CD4 hoặc tế bào T dương tính với CD8 từ hai con khi khác nhau với sự có mặt của các tế bào đích khối u. Thử nghiệm được tiến hành như được nêu trên, với sự có mặt hoặc không có mặt của MCSP ở người biểu hiện tế bào khối u MV-3, với tỷ lệ E:T bằng 3:1 và thời gian ủ là khoảng 41 giờ.

Như được thể hiện trên Fig.60, cả hai cấu trúc đều có thể điều tiết tăng CD25 trên các tế bào T dương tính với CD4 và tế bào T dương tính với CD8 theo cách phụ thuộc vào hàm lượng, không khác biệt đáng kể giữa hai dạng. Các mẫu đối chứng không có kháng thể và không có tế bào đích tạo ra tín hiệu đáng kể đối với các mẫu với kháng thể mà không có các đích (không được thể hiện).

Ví dụ 5

Sự tiết interferon- γ khi hoạt hóa các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người với các cấu trúc đặc hiệu kép CD3

MCSP ở người và CD3 ở người đích “2+1 IgG scFab” được tinh chế (SEQ ID NO 5, 17, 19) được phân tích về khả năng của nó để kích thích sự hoạt hóa tế bào T với sự có mặt của Các tế bào U-87MG dương tính với MCSP ở người, được xác định bằng sự giải phóng của interferon (IFN)- γ ở người vào dịch nổi. Để làm đối chứng, các IgG của MCSP kháng người và IgG của CD3 kháng người được sử dụng, được điều chỉnh đến cùng nồng độ phân tử gam. Một cách ngắn gọn, các tế bào đích u bào hình sao của u nguyên bào đệm U-87MG biểu hiện huMCSP (ECACC 89081402) được thu gom với chất đệm phân ly tế bào, được rửa và được tái tạo huyền phù trong môi trường AIM-V (Invitrogen #12055-091). 20 000 tế bào cho mỗi lỗ được cấy đĩa trong đĩa đáy tròn có 96 lỗ và bổ sung chất pha loãng kháng thể tương ứng vào nồng độ cuối cùng thu được là 1 nM. Bổ sung tế bào tác động T bao gồm toàn bộ ở người, được phân lập từ Buffy Coat vào tỷ lệ E:T cuối cùng là 5:1. Sau khi ủ qua đêm ở 18,5 giờ ở 37°C, 5% CO₂, đĩa thử nghiệm được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 3500m/s² và dịch nổi được đưa vào đĩa sạch có 96 lỗ. Các mức IFN- γ ở người trong dịch nổi được xác định bằng ELISA, theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (BD OptEIA IFN- γ ở người ELISA Kit II từ Becton Dickinson, #550612).

Như được biểu thị trên Fig.26, các IgG tham khảo thể hiện không có sự kích thích yếu của sự tiết IFN- γ , trong đó cấu trúc “2+1 IgG scFab” có khả năng hoạt hóa tế bào T ở người để tiết IFN- γ .

Ví dụ 6

Độc tố tế bào T được hướng lại được điều tiết bởi các cấu trúc liên kết chéo đặc hiệu kép tạo đích CD3 trên tế bào T và MCSP hoặc EGFR trên tế bào khối u (thử nghiệm giải phóng LDH)

Trong loạt đầu tiên của các thử nghiệm, các cấu trúc đặc hiệu kép đích CD3 và MCSP được phân tích đối với khả năng của chúng để kích thích gây chết tế bào theo chương trình được tạo ra bởi tế bào T trong các tế bào đích khối u khi liên kết chéo cấu trúc thông qua gắn kết của gốc gắn kết kháng nguyên với đích kháng nguyên tương ứng của chúng trên tế bào (Fig. 27-38).

Trong một thử nghiệm, các cấu trúc “2+1 IgG scFab” (SEQ ID NO 5, 21, 23) và “2+1 IgG Crossfab” được tinh chế (SEQ ID NO 3, 5, 29, 33) đích CD3 ở người và MCSP ở người, và phân tử “(scFv)₂” tương ứng được so sánh. Một cách ngắn gọn, các tế bào đích u hắc sắc tố ở người MDA-MB-435 biểu hiện huMCSP được thu gom với chất đệm phân ly tế bào, được rửa và được tái tạo huyền phù trong môi trường AIM-V (Invitrogen # 12055-091). 30 000 tế bào cho mỗi lỗ được cấy đĩa trong đĩa đáy tròn có 96 lỗ và bổ sung chất pha loãng tương ứng của cấu trúc vào ở hàm lượng đã định. Tất cả cấu trúc và các IgG đối chứng tương ứng được điều chỉnh đến cùng nồng độ phân tử gam. Bổ sung tế bào tác động T bao gồm toàn bộ ở người thu được tỷ lệ E:T cuối cùng bằng 5:1. Để làm đối chứng dương cho sự kích hoạt của các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người, 1 µg/ml PHA-M (Sigma #L8902; hỗn hợp của các isolectin được phân lập từ *Phaseolus vulgaris*) được sử dụng. Để bình thường hóa, sự phân giải tối đa của các tế bào đích (= 100%) được xác định bằng cách ủ các tế bào đích với hàm lượng cuối cùng là 1% Triton X-100. Sự phân giải tối thiểu (= 0%) chỉ các tế bào đích được ủ cùng với tế bào tác động, nhưng không với cấu trúc hoặc kháng thể bất kỳ. Sau khi ủ qua đêm 20 giờ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂, sự giải phóng LDH của các tế bào đích gây chết tế bào theo chương trình/chết hoại vào dịch nổi được xác định bằng kit phát hiện LDH (Roche Applied Science, #11 644 793 001), theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Như được biểu thị trên Fig.27, cả hai cấu trúc “2+1” kích thích gây chết tế bào theo chương trình trong các tế bào đích so với phân tử “(scFv)₂”.

Ngoài ra, các cấu trúc “2+1 IgG Crossfab” (SEQ ID NO 3, 5, 29, 33) và “2+1 IgG scFab” được tinh chế khác với miền Fc của chúng, cũng như phân tử “(scFv)₂”, được so sánh. Sự đột biến khác nhau trong miền Fc (L234A+L235A (LALA), P329G và/hoặc N297D, như được chỉ ra) giảm hoặc hủy bỏ (NK) chức năng tế bào tác động được gây ra bởi các cấu trúc chứa miền Fc (wt) kiểu dại. Các quy trình thử nghiệm là như được nêu trên.

Fig.28 thể hiện rằng tất cả cấu trúc kích thích sự chết tế bào theo chương trình trong các tế bào đích so với phân tử “(scFv)₂”.

Fig.29 thể hiện kết quả so sánh của “2+1 IgG scFab” (SEQ ID NO 5, 17, 19) được tinh chế và phân tử “(scFv)₂” đối với khả năng của chúng để kích thích gây chết tế bào theo chương trình được tạo ra bởi tế bào T trong các tế bào đích khối u. Các quy trình thử nghiệm như được mô tả ở trên, sử dụng các tế bào đích u hắc sắc tố Colo-38 ở người biểu hiện huMCSP theo tỷ lệ E:T là 5:1, và ủ qua đêm trong 18,5 giờ. Như được biểu thị trên hình vẽ, cấu trúc “2+1 IgG scFab” thể hiện hoạt tính độc tố tế bào có thể so sánh được với phân tử “(scFv)₂”.

Tương tự, Fig.30 thể hiện kết quả so sánh của cấu trúc “2+1 IgG scFab” được tinh chế (SEQ ID NO 5, 17, 19) và phân tử “(scFv)₂”, sử dụng các tế bào đích u hắc sắc tố Colo-38 ở người biểu hiện huMCSP theo tỷ lệ E:T bằng 5:1 và thời gian ủ là 18 giờ. Như được biểu thị trên hình vẽ, cấu trúc “2+1 IgG scFab” thể hiện hoạt tính độc tố tế bào có thể so sánh được với phân tử (scFv)₂.

Fig.31 thể hiện kết quả so sánh của cấu trúc “2+1 IgG scFab” được tinh chế (SEQ ID NO 5, 17, 19) và phân tử “(scFv)₂”, sử dụng các tế bào đích u hắc sắc tố MDA-MB-435 ở người biểu hiện huMCSP theo tỷ lệ E:T bằng 5:1 và ủ qua đêm 23,5 giờ. Như được biểu thị trên hình vẽ, cấu trúc kích thích gây chết tế bào theo chương trình trong các tế bào đích so sánh với phân tử “(scFv)₂”. Cấu trúc “2+1 IgG scFab” thể hiện hiệu quả giảm ở các hàm lượng cao nhất.

Ngoài ra, các cấu trúc đặc hiệu kép khác nhau mà có hóa trị một với cả hai đích, CD3 ở người và MCSP ở người, cũng như phân tử “(scFv)₂” tương ứng được phân tích đối với khả năng của chúng để kích thích gây chết tế bào theo chương trình được tạo ra bởi tế bào T. Fig.32 thể hiện các kết quả đối với các cấu trúc “1+1 IgG scFab, một nhánh” (SEQ ID NO 1, 3, 5) và “1+1 IgG scFab, một nhánh đảo ngược” (SEQ ID NO 7, 9, 11), sử dụng các tế bào đích u hắc sắc tố Colo-38 ở người biểu hiện huMCSP theo tỷ lệ E:T bằng 5:1, và thời gian ủ là 19 giờ. Như được biểu thị trên hình vẽ, cả hai cấu trúc “1+1” đều ít hoạt tính hơn so với phân tử “(scFv)₂”, với phân tử “1+1 IgG scFab, một nhánh” là tốt hơn so với phân tử “1+1 IgG scFab, một nhánh đảo ngược” trong thử nghiệm này.

Fig.33 thể hiện các kết quả đối với cấu trúc “1+1 IgG scFab” (SEQ ID NO 5, 21, 213), sử dụng các tế bào đích u hắc sắc tố Colo-38 ở người biểu hiện huMCSP theo tỷ lệ E:T

bằng 5:1, và thời gian ủ là 20 giờ. Như được biểu thị trên hình vẽ, cấu trúc “1+1 IgG scFab” ít độc tố hơn so với phân tử “(scFv)₂”.

Trong thử nghiệm khác, “2+1 IgG Crossfab” (SEQ ID NO 3, 5, 29, 33), “1+1 IgG Crossfab” được tinh chế (SEQ ID NO 5, 29, 31, 33) và phân tử “(scFv)₂” được phân tích đối với khả năng của chúng để kích thích gây chết tế bào theo chương trình được tạo ra bởi tế bào T trong các tế bào đích khối u khi liên kết chéo cấu trúc thông qua gắn kết của cả hai kháng nguyên đích, CD3 và MCSP, trên tế bào. Tế bào u hắc sắc tố MDA-MB-435 ở người biểu hiện huMCSP được sử dụng làm các tế bào đích, tỷ lệ E:T bằng 5:1, và thời gian ủ 20 giờ. Các kết quả được thể hiện trên Fig.34. Cấu trúc “2+1 IgG Crossfab” kích thích gây chết tế bào theo chương trình trong các tế bào đích so sánh với phân tử “(scFv)₂”. So sánh các dạng “IgG Crossfab” hóa trị một và hóa trị hai rõ ràng thể hiện rằng dạng hóa trị hai là hiệu nghiệm hơn nhiều.

Theo thử nghiệm khác nữa, cấu trúc “2+1 IgG Crossfab” được tinh chế (SEQ ID NO 3, 5, 29, 33) được phân tích về khả năng của nó để kích thích gây chết tế bào theo chương trình được tạo ra bởi tế bào T trong các tế bào đích (khối u) khác nhau. Một cách ngắn gọn, các tế bào đích khối u dương tính MCSP Colo-38, tế bào gốc trung mô (thu được từ tủy xương, Lonza #PT-2501 hoặc mô adipoza, Invitrogen #R7788-115) hoặc các tế bào quanh mao mạch (từ nhau thai; PromoCell #C-12980), như được chỉ ra, được thu gom với chất đệm phân ly tế bào, được rửa và được tái tạo huyền phù trong môi trường AIM-V (Invitrogen #12055-091). 30 000 tế bào cho mỗi lỗ được cấy đĩa trong đĩa đáy tròn có 96 lỗ và bổ sung chất pha loãng kháng thể tương ứng vào ở các hàm lượng đã chỉ ra. Bổ sung các tế bào tác động PBMC ở người được phân lập từ máu tươi của thể cho khỏe mạnh thu được tỷ lệ E:T cuối cùng bằng 25:1. Sau khi ủ 4 giờ ở 37°C, 5% CO₂, sự giải phóng LDH của các tế bào đích gây chết tế bào theo chương trình/chết hoại vào dịch nổi được xác định bằng bộ kit phát hiện LDH (Roche Applied Science, #11 644 793 001), theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Như được biểu thị trên Fig.35, có thể quan sát thấy độc tố tế bào do tế bào T gây ra đáng kể chỉ với tế bào Colo-38. Kết quả này tương tự với các tế bào Colo-38 biểu hiện các mức đáng kể của MCSP, trong đó tế bào gốc trung mô và các tế bào quanh mao mạch biểu hiện MCSP chỉ rất yếu.

Cấu trúc “2+1 IgG scFab” (SEQ ID NO 5, 17, 19) được tinh chế và phân tử “(scFv)₂” cũng được so sánh với kháng thể IgG của MCSP kháng người được thiết kế di truyền glyco, có tỷ lệ giảm của N-glycan được fucosyl hóa trong miền Fc của nó (MCSP GlycoMab). Đối với thử nghiệm này, các tế bào đích u hắc sắc tố Colo-38 ở người biểu hiện huMCSP và tế

bào tác động PBMC ở người được sử dụng, hoặc ở tỷ lệ E:T cố định bằng 25:1 (Fig.36A), hoặc ở tỷ lệ E:T khác nhau nằm trong khoảng từ 20:1 đến 1:10 (Fig.36B). Các phân tử khác nhau được sử dụng ở các hàm lượng được chỉ ra trên Fig.36A, hoặc ở hàm lượng cố định bằng 1667 pM (Fig.36B). Các số liệu được đưa ra được thực hiện sau 21 giờ ủ. Như được biểu thị trên Fig.36 A và Fig.36 B, cả hai cấu trúc đặc hiệu kép thể hiện hiệu nghiệm cao hơn so với MSCP GlycoMab.

Theo thử nghiệm khác nữa, phân tích CD3 ở khi đích “2+1 IgG Crossfab” được tinh chế và MCSP ở người (SEQ ID NO 3, 5, 35, 37). Một cách ngắn gọn, các tế bào đích khối u MV-3 biểu hiện MCSP ở người được thu gom với chất đệm phân ly tế bào, được rửa và được tái tạo huyền phù trong DMEM có chứa 2% FCS và 1% GlutaMax. 30 000 tế bào cho mỗi lỗ được cấy đĩa trong đĩa đáy tròn có 96 lỗ và chất pha loãng tương ứng của cấu trúc hoặc bổ sung IgG tham chiếu vào ở các hàm lượng đã nêu. Cấu trúc đặc hiệu kép và các đối chứng IgG khác nhau được điều chỉnh đến cùng nồng độ phân tử gam. Bổ sung tế bào tác động PBMC ở khi, được phân lập từ máu của khi khỏe mạnh, thu được tỷ lệ E:T cuối cùng bằng 3:1. Sau khi ủ trong 24 giờ hoặc 43 giờ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂, sự giải phóng LDH của các tế bào đích gây chết tế bào theo chương trình/chết hoại vào dịch nổi được xác định bằng bộ kit phát hiện LDH (Roche Applied Science, #11 644 793 001), theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Như được biểu thị trên Fig.37, cấu trúc đặc hiệu kép gây ra sự giải phóng LDH từ các tế bào đích phụ thuộc vào hàm lượng. Hiệu quả này là mạnh hơn sau 43 giờ so với sau 24 giờ. IgG kháng-cynoCD3 (dòng FN-18) cũng có khả năng để kích thích sự giải phóng LDH của các tế bào đích không được liên kết chéo.

Fig.38 thể hiện kết quả so sánh của “2+1 IgG Crossfab” được tinh chế (SEQ ID NO 3, 5, 29, 33) và cấu trúc “(scFv)₂”, sử dụng dòng tế bào u melanin ở người biểu hiện MCSP (MV-3) làm các tế bào đích và các PBMC ở người làm tế bào tác động với tỷ lệ E:T bằng 10:1 và thời gian ủ là 26 giờ. Như được biểu thị trên hình vẽ, cấu trúc “2+1 IgG Crossfab” là hiệu nghiệm hơn xét về EC50 so với phân tử “(scFv)₂”.

Trong loạt thứ hai của thử nghiệm, các cấu trúc đặc hiệu kép đích CD3 và EGFR được phân tích đối với khả năng của chúng để kích thích gây chết tế bào theo chương trình được tạo ra bởi tế bào T trong các tế bào đích khối u khi liên kết chéo của cấu trúc thông qua gắn kết của gốc gắn kết kháng nguyên với kháng nguyên đích tương ứng của chúng trên tế bào (Fig. 39-Fig.41).

Trong một thử nghiệm, các cấu trúc “2+1 IgG scFab” (SEQ ID NO 45, 47, 53) và “1+1 IgG scFab” (SEQ ID NO 47, 53, 213) được tinh chế đích CD3 và EGFR, và phân tử “(scFv)₂” tương ứng được so sánh. Một cách ngắn gọn, các tế bào đích khối u LS-174T biểu hiện EGFR ở người được thu gom với trypsin, được rửa và được tái tạo huyền phù trong môi trường AIM-V (Invitrogen # 12055-091). 30 000 tế bào cho mỗi lỗ được cấy đĩa trong đĩa đáy tròn có 96 lỗ và bổ sung chất pha loãng kháng thể tương ứng vào ở các hàm lượng đã chỉ ra. Tất cả cấu trúc và các đối chứng được điều chỉnh đến cùng nồng độ phân tử gam. Bổ sung tế bào tác động T bao gồm toàn bộ ở người vào thu được tỷ lệ E:T cuối cùng là 5:1. Để làm đối chứng dương để hoạt hóa các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người, 1 µg/ml PHA-M (Sigma #L8902) được sử dụng. Để bình thường hóa, sự phân giải tối đa của các tế bào đích (= 100%) được xác định bằng cách ủ các tế bào đích với hàm lượng cuối cùng là 1% Triton X-100. Sự phân giải tối thiểu (= 0%) chỉ các tế bào đích được ủ cùng với tế bào tác động, nhưng không với cấu trúc hoặc kháng thể bất kỳ. Sau khi ủ qua đêm trong 18 giờ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂, sự giải phóng LDH của các tế bào đích gây chết tế bào theo chương trình/chết hoại vào dịch nổi được xác định bằng bộ kit phát hiện LDH (Roche Applied Science, #11 644 793 001), theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Như được biểu thị trên Fig.39, cấu trúc “2+1 IgG scFab” thể hiện hoạt tính độc tố tế bào có thể so sánh được với phân tử “(scFv)₂”, trong đó cấu trúc “1+1 IgG scFab” là ít hoạt tính.

Theo thử nghiệm khác nữa, “1+1 IgG scFab, một nhánh” (SEQ ID NO 43, 45, 47), “1+1 IgG scFab, một nhánh đảo ngược” (SEQ ID NO 11, 49, 51), “1+1 IgG scFab” (SEQ ID NO 47, 53, 213) được tinh chế, và phân tử “(scFv)₂” được so sánh. Điều kiện thử nghiệm như được nêu trên, ngoại trừ thời gian ủ là 21 giờ.

Như được biểu thị trên Fig.40, cấu trúc “1+1 IgG scFab” thể hiện hoạt tính độc tố tế bào hơi thấp hơn so với phân tử “(scFv)₂” trong thử nghiệm này. Cả hai cấu trúc “1+1 IgG scFab, một nhánh (đảo ngược)” ít hơn một cách rõ ràng so với phân tử “(scFv)₂”.

Trong thử nghiệm khác nữa, các cấu trúc “1+1 IgG scFab, một nhánh” (SEQ ID NO 43, 45, 47) và “1+1 IgG scFab, một nhánh đảo ngược” (SEQ ID NO 11, 49, 51) được tinh chế và phân tử “(scFv)₂” được so sánh. Thời gian ủ trong thử nghiệm này là 16 giờ, và kết quả được thể hiện trên Fig.41. Được ủ với các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người, cả hai cấu trúc “1+1 IgG scFab, một nhánh (đảo ngược)” đều ít hoạt tính hơn so với phân tử “(scFv)₂”, nhưng thể hiện sự giải phóng phụ thuộc vào hàm lượng của LDH từ các tế bào đích (Fig.41A). Khi đồng nuôi cấy tế bào khối u LS-174T với tế bào T tự nhiên được phân lập từ

các PBMC, các cấu trúc chỉ có hoạt tính cơ bản – hoạt tính nhất trong số đó là phân tử “(scFv)₂” (Fig.41B).

Trong thử nghiệm khác, “1+1 IgG scFab, một nhánh đảo ngược” (SEQ ID NO 11, 51, 55), “1+1 IgG scFab” (57, 61, 213), và “2+1 IgG scFab” (57, 59, 61) được tinh chế đích CD3 và protein hoạt hóa nguyên bào sợi - Fibroblast Activation Protein (FAP), và phân tử “(scFv)₂” tương ứng được phân tích đối với khả năng của chúng để kích thích gây chết tế bào theo chương trình được tạo ra bởi tế bào T trong các tế bào GM05389 của nguyên bào sợi biểu hiện FAP ở người khi liên kết chéo của cấu trúc thông qua gắn kết của cả hai gốc đích với kháng nguyên đích tương ứng của chúng trên các tế bào. Một cách ngắn gọn, các tế bào đích GM05389 ở người được thu gom với trypsin vào ngày trước, được rửa và được tái tạo huyền phù trong môi trường AIM-V (Invitrogen #12055-091). 30 000 tế bào cho mỗi lỗ được cấy đĩa trong đĩa đáy tròn có 96 lỗ và được ủ qua đêm ở 37°C, 5% CO₂ cho phép tế bào thu hồi và bám dính. Ngày tiếp theo, các tế bào được ly tâm, dịch nổi được gạn chất và môi trường sạch, cũng như chất pha loãng tương ứng của các cấu trúc hoặc bổ sung IgG tham khảo vào hàm lượng đã chỉ ra. Tất cả cấu trúc và các đối chứng được điều chỉnh đến cùng nồng độ phân tử gam. Bổ sung tế bào tác động T bao gồm toàn bộ ở người thu được tỷ lệ E:T cuối cùng là 5:1. Để làm đối chứng dương để hoạt hóa các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người, sử dụng 5 µg/ml PHA-M (Sigma #L8902). Để bình thường hóa, sự phân giải tối đa của các tế bào đích (= 100%) được xác định bằng cách ủ các tế bào đích với hàm lượng cuối cùng là 1% Triton X-100. Sự phân giải tối thiểu (= 0%) chỉ các tế bào đích được ủ cùng với tế bào tác động, nhưng không có cấu trúc hoặc kháng thể bất kỳ. Sau khi bổ sung, ủ qua đêm trong 18 giờ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂, sự giải phóng LDH của các tế bào đích gây chết tế bào theo chương trình/chết hoại vào dịch nổi được xác định bằng bộ kit phát hiện LDH (Roche Applied Science, #11 644 793 001), theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Như được biểu thị trên Fig.42, cấu trúc “2+1 IgG scFab” thể hiện hoạt tính độc tố tế bào có thể so sánh được với phân tử “(scFv)₂” xét về các trị số EC₅₀. Cấu trúc “1+1 IgG scFab, một nhánh đảo ngược” có hoạt tính ít hơn so với các cấu trúc khác được thử nghiệm trong thử nghiệm này.

Một bộ thử nghiệm khác nữa, CD3/MCSP “2+1 IgG Crossfab, chuỗi nhẹ được liên kết” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 179) được so với CD3/MCSP “2+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33). Một cách ngắn gọn, các tế bào đích (Colo-38 ở người, MV-3 ở người hoặc tế bào u hắc sắc tố WM266-4) được thu gom với chất đệm phân ly tế bào vào ngày thử nghiệm (hoặc với trypsin một ngày trước khi thử nghiệm được bắt đầu), được rửa

và tái tạo huyền phù trong môi trường nuôi cấy tế bào thích hợp (RPMI1640, bao gồm 2% FCS và 1% Glutamax). 20 000 - 30 000 tế bào cho mỗi lỗ được cấy đĩa trong đĩa 96 lỗ đáy phẳng và bổ sung chất pha loãng kháng thể tương ứng vào như được chỉ ra (3 phiên bản). Các PBMC là tế bào tác động được thêm vào thu được tỷ lệ chất tác động với tế bào đích (E:T) là 10:1. Tất cả cấu trúc và các đối chứng được điều chỉnh đến cùng nồng độ phân tử gam, thời gian ủ là 22 giờ. Việc phát hiện của sự giải phóng LDH và bình thường hóa được tiến hành như được nêu trên.

Fig.49 đến Fig.52 thể hiện kết quả của bốn thử nghiệm được tiến hành với tế bào u hắc sắc tố MV-3 (Fig.49), tế bào Colo-38 (Fig.50 và Fig.51) hoặc tế bào WM266-4 (Fig.52). Như được thể hiện trên Fig.49, cấu trúc với chuỗi nhẹ được liên kết là ít hiệu nghiệm hơn so với cấu trúc không có chuỗi nhẹ được liên kết trong thử nghiệm với tế bào MV-3 làm các tế bào đích. Như được thể hiện trên Fig.50 và 51, cấu trúc với chuỗi nhẹ được liên kết là hiệu nghiệm hơn so với cấu trúc không có chuỗi nhẹ được liên kết trong các thử nghiệm với các tế bào Colo-38 biểu hiện MCSP cao làm các tế bào đích. Cuối cùng, như được thể hiện trên Fig.52, có sự khác biệt không đáng kể giữa hai các cấu trúc khi tế bào WM266-4 biểu hiện MCSP cao được sử dụng làm các tế bào đích.

Theo thử nghiệm khác nữa, hai cấu trúc “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược” đích CEA được so sánh, trong đó trong mảnh Crossfab hoặc vùng V (VL/VH, xem SEQ ID NOs 33, 63, 65, 67) hoặc vùng C (CL/CH1, xem SEQ ID NO 65, 67, 183, 197) được chuyển đổi. Thử nghiệm được tiến hành như được nêu trên, sử dụng các PBMC ở người làm tế bào tác động và các tế bào đích biểu hiện CEA ở người. Các tế bào đích (tế bào khối u MKN-45 hoặc LS-174T) được thu gom với trypsin-EDTA (LuBiosciences #25300-096), được rửa và được tái tạo huyền phù trong RPMI1640 (Invitrogen #42404042), bao gồm 1% Glutamax (LuBiosciences #35050087) và 2% FCS. 30 000 tế bào cho mỗi lỗ được cấy đĩa trong đĩa đáy tròn có 96 lỗ và các cấu trúc đặc hiệu kép được thêm vào ở các hàm lượng đã chỉ ra. Tất cả cấu trúc và các đối chứng được điều chỉnh đến cùng nồng độ phân tử gam. Bổ sung các tế bào tác động PBMC ở người vào thu được tỷ lệ E:T cuối cùng bằng 10:1, thời gian ủ là 28 giờ. Các trị số EC50 được tính bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism 5.

Như được thể hiện trên Fig.61, cấu trúc với sự chuyển đổi CL/CH1 thể hiện hoạt tính hơi tốt hơn trên cả hai dòng tế bào đích so với cấu trúc với sự chuyển đổi VL/VH. Các trị số EC50 được tính lần lượt là 115 và 243 pM trên tế bào MKN-45, và 673 và 955 pM trên các tế bào LS-174T, đối với cấu trúc chuyển đổi CL/CH1 và cấu trúc chuyển đổi VL/VH.

Tương tự, hai cấu trúc “2+1 IgG Crossfab” đích MCSP được so sánh, trong đó trong mảnh Crossfab hoặc vùng V (VL/VH, xem các SEQ ID NO 33, 189, 191, 193) hoặc vùng C (CL/CH1, xem các SEQ ID NO 183, 189, 193, 195) được chuyển đổi. Thử nghiệm được tiến hành như được nêu trên, sử dụng các PBMC ở người làm tế bào tác động và các tế bào đích biểu hiện MCSP ở người. Các tế bào đích (WM266-4) được thu gom với chất đệm phân ly tế bào (LuBiosciences #13151014), được rửa và được tái tạo huyền phù trong RPMI1640 (Invitrogen #42404042), bao gồm 1% Glutamax (LuBiosciences #35050087) và 2% FCS. 30 000 tế bào cho mỗi lỗ được cấy đĩa trong đĩa đáy tròn có 96 lỗ và bổ sung các cấu trúc vào ở các hàm lượng đã chỉ ra. Tất cả cấu trúc và các đối chứng được điều chỉnh đến cùng nồng độ phân tử gam. Các tế bào tác động PBMC ở người được thêm vào thu được tỷ lệ E:T cuối cùng bằng 10:1, thời gian ủ là 26 giờ. Các trị số EC50 được tính bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism 5.

Như được biểu thị trên Fig.62, hai cấu trúc thể hiện hoạt tính có thể so sánh được, cấu trúc với sự chuyển đổi CL/CH1 có trị số EC50 hơi thấp hơn (12,9 pM đối với cấu trúc chuyển đổi CL/CH1, được so với 16,8 pM đối với cấu trúc chuyển đổi VL/VH).

Fig.63 thể hiện kết quả của thử nghiệm tương tự, được tiến hành với các tế bào đích MV-3 biểu hiện MCSP ở người. Một lần nữa, cả hai cấu trúc thể hiện hoạt tính có thể so sánh được, cấu trúc với sự chuyển đổi CL/CH1 có trị số EC50 hơi thấp hơn (xấp xỉ 11,7 pM đối với cấu trúc chuyển đổi CL/CH1, so với khoảng 82,2 pM đối với cấu trúc chuyển đổi VL/VH). Các trị số EC50 chính xác không thể tính được, vì đường cong tiêu diệt không đạt đến trạng thái bình ổn ở các hàm lượng cao của hợp chất.

Trong thử nghiệm khác, các cấu trúc CD3/MCSP “2+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 3, 5, 29, 33) và “1+1 IgG Crossfab” (xem SEQ ID NO 5, 29, 33, 181) được so sánh với CD3/MCSP “1+1 CrossMab” (xem SEQ ID NO 5, 23, 183, 185). Thử nghiệm được tiến hành như được nêu trên, sử dụng các PBMC ở người làm tế bào tác động và WM266-4 hoặc các tế bào đích MV-3 (tỷ lệ E:T = 10:1) và thời gian ủ là 21 giờ.

Như được thể hiện trên Fig.64, cấu trúc “2+1 IgG Crossfab” là phân tử hiệu nghiệm nhất trong thử nghiệm này, sau đó là “1+1 IgG Crossfab” và “1+1 CrossMab”. Sự sắp xếp này thậm chí đáng chú ý hơn với tế bào MV-3, biểu hiện mức độ môi trường của MCSP, so với tế bào WM266-4 biểu hiện MCSP cao. Các trị số EC50 được tính trên tế bào MV-3 lần lượt bằng 9,2, 40,9 và 88,4 pM, trên tế bào WM266-4 33,1, 28,4 và 53,9 pM, đối với “2+1 IgG Crossfab”, “1+1 IgG Crossfab” và “1+1 CrossMab”,.

Trong thử nghiệm khác, các lượng khác nhau của cấu trúc “dung hợp 1+1 IgG Crossfab LC” (SEQ ID NO 183, 209, 211, 213) được kiểm tra, sử dụng các tế bào đích khối u MKN-45 hoặc LS-174T và tế bào tác động PBMC ở người theo tỷ lệ E:T bằng 10:1 và thời gian ủ là 28 giờ. Như được thể hiện trên Fig.65, cấu trúc “dung hợp 1+1 IgG Crossfab LC” kích thích sự gây chết tế bào theo chương trình trong các tế bào đích MKN-45 với EC50 được tính bằng 213 pM, trong đó EC50 được tính bằng 1,56 nM với các tế bào LS-174T, thể hiện ảnh hưởng của các mức biểu hiện kháng nguyên khối u khác nhau đối với hiệu nghiệm của các cấu trúc đặc hiệu kép trong khoảng thời gian nhất định,.

Theo thử nghiệm khác nữa, cấu trúc “dung hợp 1+1 IgG Crossfab LC” (SEQ ID NO 183, 209, 211, 213) được so với phân tử “2+1 IgG Crossfab” chưa có đích. Sử dụng tế bào khối u MC38-huCEA và các PBMC ở người (tỷ lệ E:T = 10:1) và thời gian ủ là 24 giờ. Như được thể hiện trên Fig.66, cấu trúc “dung hợp 1+1 IgG Crossfab LC” đã đích thích sự gây chết tế bào theo chương trình của các tế bào đích theo cách phụ thuộc vào hàm lượng, với trị số EC50 được tính bằng xấp xỉ 3,2 nM. Trái lại, “2+1 IgG Crossfab” chưa được tạo đích đã cho thấy việc tiêu diệt do tế bào T độc lập với kháng nguyên gây ra của các tế bào đích chỉ ở hàm lượng cao nhất.

Trong thử nghiệm cuối cùng, “2+1 IgG Crossfab (V9)” (SEQ ID NO 3, 5, 29, 33), “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược (V9)” (SEQ ID NO 5, 23, 183, 187), “2+1 IgG Crossfab (kháng-CD3)” (SEQ ID NO 5, 23, 215, 217), “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược (kháng-CD3)” (SEQ ID NO 5, 23, 215, 219) được so sánh, sử dụng tế bào khối u MV-3 hoặc WM266-4 dương tính với MCSP ở người và các PBMC ở người (tỷ lệ E:T = 10:1), và thời gian ủ là khoảng 24 giờ. Như được biểu thị trên Fig.67, việc tiêu diệt được gây ra bởi tế bào T của các cấu trúc “2+1 IgG Crossfab, đảo ngược” dường như là hơi mạnh hơn hoặc ít nhất bằng việc tiêu diệt được gây ra bởi các cấu trúc “2+1 IgG Crossfab” đối với cả hai chất liên kết CD3. Các trị số EC50 được tính như sau:

EC50 [pM]	2+1 IgG Crossfab (V9)	2+1 IgG Crossfab đảo ngược (V9)	2+1 IgG Crossfab (kháng-CD3)	2+1 IgG Crossfab, đảo ngược (kháng-CD3)
MV-3	10,0	4,1	11,0	3,0
WM266-4	12,4	3,7	11,3	7,1

Ví dụ 7

Thử nghiệm CD107a/b

Cấu trúc “2+1 IgG scFab” được tinh chế (SEQ ID NO 5, 17, 19) và phân tử “(scFv)₂”, cả hai đích MCSP ở người và CD3 ở người, được kiểm tra bằng bào kế chảy về khả năng của chúng để điều tiết tăng CD107a và các mức perforin nội bào với sự có mặt hoặc không có mặt của tế bào khối u biểu hiện MCSP ở người.

Một cách ngắn gọn, vào ngày một, cấy 30 000 tế bào đích khối u Colo-38 cho mỗi lỗ trong đĩa đáy tròn có 96 lỗ và được ủ qua đêm ở 37°C, 5% CO₂ để chúng bám dính. Các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người ban đầu được phân lập vào ngày 1 hoặc ngày 2 từ Buffy Coat, như được nêu.

Vào ngày hai, bổ sung 0,15 triệu tế bào tác động cho mỗi lỗ vào thu được tỷ lệ E:T cuối cùng bằng 5:1. Kháng thể CD107a/b được kết hợp với FITC, cũng như các cấu trúc đặc hiệu kép khác nhau và các đối chứng được thêm vào. Các phân tử đặc hiệu kép khác nhau và các kháng thể được điều chỉnh đến cùng nồng độ phân tử gam thu được nồng độ cuối cùng là 9,43 nM. Sau bước ủ 1 giờ ở nhiệt độ 37°C, bổ sung 5% CO₂, monensin để ức chế sự tiết, nhưng đồng thời trung hòa độ pH trong các endosom và các lysosom. Sau thời gian ủ thêm là 5 giờ, tế bào được nhuộm màu ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút trong để biểu hiện CD8 bề mặt. Tế bào được rửa bằng chất đệm nhuộm màu (PBS / 0,1% BSA), được cố định và được thấm trong 20 phút sử dụng BD Cytotfix/Cytoperm Plus Kit với BD Golgi Stop (BD Biosciences #554715). Tế bào được rửa hai lần sử dụng 1 x BD Perm/Chất đệm rửa, và nhuộm màu nội bào đối với perforin được tiến hành ở 4°C trong 30 phút. Sau bước rửa cuối cùng với 1 x BD Perm/chất đệm rửa, tế bào được tái tạo huyền phù trong PBS / 0,1% BSA và được phân tích trên FACS CantoII (tất cả kháng thể được mua từ BD Biosciences hoặc BioLegend).

Các cổng được thiết lập trên tất cả các tế bào dương tính với CD107a/b, tế bào dương tính với perforin hoặc các tế bào dương tính kép, như được biểu thị, như được chỉ ra (Fig.43). Cấu trúc “2+1 IgG scFab” có khả năng hoạt hóa tế bào T và điều tiết tăng CD107a/b và các mức perforin nội bào chỉ với sự có mặt của các tế bào đích (Fig.43A), trong đó phân tử “(scFv)₂” thể hiện sự kích thích (yếu) sự hoạt hóa của tế bào T đồng thời khi không có mặt của các tế bào đích (Fig.43B). IgG kháng-CD3 tham khảo hóa trị hai tạo ra mức hoạt hóa thấp hơn so với phân tử “(scFv)₂” hoặc cấu trúc đặc hiệu kép khác.

Ví dụ 8

Thử nghiệm sự tăng sinh

“2+1 IgG scFab” (SEQ ID NO 5, 17, 19) được tinh chế và các phân tử “(scFv)₂”, cả hai đích CD3 ở người và MCSP ở người, được kiểm tra bằng bào kế chảy đối với khả năng của chúng để kích thích sự tăng sinh của tế bào T dương tính với CD8 hoặc dương tính với CD4 với sự có mặt và không có mặt của tế bào khối u biểu hiện MCSP ở người.

Một cách ngắn gọn, các tế bào T bao gồm toàn bộ ở người mới được phân lập được điều chỉnh đến 1 triệu tế bào cho một ml trong PBS ấm và được nhuộm với 1 μ M CFSE ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Thể tích nhuộm được gấp đôi lên bằng cách bổ sung môi trường RPMI1640, có chứa 10% FCS và 1% GlutaMax. Sau khi ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút nữa, các tế bào được rửa ba lần bằng môi trường được gia nhiệt trước để loại bỏ CFSE còn lại. Tế bào Colo-38 dương tính với MCSP được thu gom với chất đệm phân ly tế bào, được đếm và được kiểm tra về khả năng sống được. Tế bào được điều chỉnh đến $0,2 \times 10^6$ (có thể sống sót) tế bào cho một ml trong môi trường AIM-V, 100 μ l hỗn dịch tế bào này được đưa bằng pipet vào mỗi lỗ trong đĩa đáy tròn 96 lỗ (như được chỉ ra). Bổ sung 50 μ l cấu trúc đặc hiệu kép (được pha loãng) vào các lỗ chứa tế bào thu được nồng độ cuối cùng là 1 nM. Tế bào tác động T bao gồm toàn bộ ở người được nhuộm màu CFSE được điều chỉnh đến 2×10^6 tế bào (có thể sống sót) cho một ml trong môi trường AIM-V. Bổ sung 50 μ l hỗn dịch tế bào này vào cho mỗi lỗ của đĩa thử nghiệm (xem ở trên) thu được tỷ lệ E:T cuối cùng bằng 5:1. Để phân tích xem là các cấu trúc đặc hiệu kép có thể hoạt hóa tế bào T chỉ với sự có mặt của các tế bào đích, biểu hiện huMCSP kháng nguyên khối u, các lỗ được bao gồm chứa 1 nM phân tử đặc hiệu kép tương ứng cũng như các PBMC, nhưng không phải các tế bào đích. Sau khi ủ trong năm ngày ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂, tế bào được ly tâm (5 phút, 3500m/s²) và được rửa hai lần bằng 150 μ l/lỗ PBS, bao gồm 0,1% BSA. Nhuộm bề mặt đối với CD8 (IgG1 ở chuột, κ ; dòng HIT8a; BD #555635), CD4 (IgG1 ở chuột, κ ; dòng RPA-T4; BD #560649), hoặc CD25 (IgG1 ở chuột, κ ; dòng M-A251; BD #555434) được tiến hành ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút, theo gợi ý của nhà cung cấp. Tế bào được rửa hai lần bằng 150 μ l/lỗ PBS có chứa 0,1% BSA, tái tạo huyền phù trong 200 μ l/lỗ PBS với 0,1% BSA, và được phân tích bằng cách sử dụng FACS CantoII machine (Phần mềm FACS Diva). Mức tăng sinh tương đối được xác định bằng cách thiết lập cổng xung quanh các tế bào không tăng sinh và sử dụng số tế bào của cổng này đối với toàn bộ số tế bào được xác định làm tham khảo.

Fig.44 thể hiện rằng tất cả cấu trúc kích thích sự tăng sinh của tế bào T dương tính với CD8 (A) hoặc tế bào T dương tính với CD4 (B) chỉ với sự có mặt của các tế bào đích, so

sánh với phân tử “(scFv)₂”. Nhìn chung, tế bào T dương tính với CD8 hoạt hoá làm tăng sinh tế bào T dương tính với CD4 hoạt hoá nhiều hơn trong thử nghiệm này.

Ví dụ 9

Thử nghiệm giải phóng xytokin

Cấu trúc “2+1 IgG scFab” được tinh chế (SEQ ID NO 5, 17, 19) và phân tử “(scFv)₂”, cả hai đích MCSP ở người và CD3 ở người, được phân tích về khả năng của chúng để kích thích sự tiết tế bào *de novo* được kích thích bởi tế bào T của xytokin với sự có mặt hoặc không có mặt của các tế bào đích khối u.

Một cách ngắn gọn, các PBMC ở người được phân lập từ lớp hồng cầu và 0,3 triệu tế bào được cấy đĩa cho mỗi lỗ vào trong đĩa đáy tròn 96 lỗ. Các tế bào đích khối u Colo-38, biểu hiện MCSP ở người, được thêm vào để thu được tỷ lệ E:T cuối cùng bằng 10:1. Các cấu trúc đặc hiệu kép và các đối chứng IgG được thêm vào ở hàm lượng cuối cùng 1 nM và các tế bào được ủ trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂. Ngày tiếp theo, các tế bào được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 3500m/s² và dịch nổi được đưa vào đĩa có 96 lỗ, lỗ sâu mới để phân tích tiếp theo. Phân tích CBA được tiến hành theo chỉ dẫn của nhà sản xuất đối với FACS CantoII, sử dụng Th1/Th2 Xytokin Kit II ở người (BD #551809).

Fig.45 thể hiện các mức của xytokin khác nhau được đo trong dịch nổi. Với sự có mặt của các tế bào đích, xytokin chính được bài tiết khi sự hoạt hóa tế bào T là IFN-γ. Phân tử “(scFv)₂” này kích thích mức IFN-γ hơi cao hơn so với cấu trúc “2+1 IgG scFab”. Xu hướng giống như vậy có thể được tìm thấy đối với TNF ở người, nhưng toàn bộ mức xytokin này là thấp hơn nhiều so với IFN-γ. Không có sự tiết đáng kể của Th2 xytokin (IL-10 và IL-4) khi hoạt hóa tế bào T với sự có mặt (hoặc sự không có mặt) của các tế bào đích. Khi không có mặt của các tế bào đích Colo-38, chỉ quan sát thấy sự kích thích rất yếu của sự tiết TNF, mà là cao nhất trong các mẫu đã được xử lý bằng phân tử “(scFv)₂”.

Trong thử nghiệm thứ hai, phân tích các cấu trúc đặc hiệu kép được tinh chế sau đây đích MCSP ở người và CD3 ở người: cấu trúc “2+1 IgG Crossfab” (SEQ ID NO 3, 5, 29, 33), phân tử “(scFv)₂”, cũng như các phân tử “2+1 IgG scFab” khác nhau chứa miền Fc kiểu đại hoặc (LALA, P329G và/hoặc N297D, như được chỉ ra) được đột biến. Một cách ngắn gọn, 280 μl máu toàn phần từ thể cho khỏe mạnh được cấy đĩa cho mỗi lỗ của đĩa có 96 lỗ, lỗ sâu. Bổ sung 30 000 tế bào đích khối u Colo-38, biểu hiện MCSP ở người, cũng như các cấu trúc đặc hiệu kép khác nhau và các đối chứng IgG ở hàm lượng cuối cùng 1 nM. Các tế bào được ủ trong 24 giờ ở 37°C, 5% CO₂ và sau đó được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 3500m/s².

Dịch nổi được đưa vào đĩa có 96 lỗ, lỗ sâu mới để phân tích tiếp theo. Phân tích CBA được tiến hành theo chỉ dẫn của nhà sản xuất đối với FACS CantoII, sử dụng hỗn hợp của bộ CBA Flex ở người: granzyme B ở người (BD #560304), IFN- γ Flex Set ở người (BD #558269), TNF Flex Set ở người (BD #558273), IL-10 Flex Set ở người (BD #558274), IL-6 Flex Set ở người (BD #558276), IL-4 Flex Set ở người (BD #558272), IL-2 Flex Set ở người (BD #558270).

Fig.46 thể hiện các mức xytokin khác nhau được đo trong dịch nổi. Xytokin chính được tiết với sự có mặt của tế bào khối u Colo-38 là IL-6, sau đó là IFN- γ . Ngoài ra, cũng các mức của granzyme B tăng mạnh khi hoạt hóa tế bào T với sự có mặt của các tế bào đích. Nhìn chung, phân tử “(scFv)₂” kích thích mức cao hơn của sự tiết xytokin với sự có mặt của các tế bào đích (Fig.46, A và B). Không có sự tiết đáng kể của các xytokin Th2 (IL-10 và IL-4) khi hoạt hóa tế bào T với sự có mặt (hoặc không có mặt) của các tế bào đích.

Trong thử nghiệm này, có sự bài tiết yếu của IFN- γ , được gây ra bởi các cấu trúc “2+1 IgG scFab”, thậm chí khi không có mặt của các tế bào đích (Fig.46, C và D). Trong các điều kiện này, có thể không quan sát thấy sự khác biệt đáng kể giữa các cấu trúc “2+1 IgG scFab” với miền Fc kiểu đại hoặc bị đột biến.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai, một trong số đó là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T và số còn lại là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, và miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai có khả năng kết hợp ổn định;

trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là

phân tử Fab lai chéo trong đó vùng biến đổi hoặc không đổi của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được chuyển đổi;

trong đó (i) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất; hoặc (ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai; và (ii) trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa không quá một gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T.

2. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm 1, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp với nhau, tùy chọn thông qua liên kết peptit.

3. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm 1 hoặc 2, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc.

4. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm 1 hoặc 2, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc.

5. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, chứa gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba mà là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích.

6. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm 5, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc.

7. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm 5 hoặc 6, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba được dung hợp ở đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của một trong số các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc, và gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai.
8. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm 5 hoặc 6, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ ba được dung hợp ở đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của một trong số các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc, và gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp tại đầu tận C của chuỗi nặng Fab với đầu tận N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất.
9. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm 7, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba và miền Fc là một phần của phân tử globulin miễn dịch, cụ thể là globulin miễn dịch lớp IgG.
10. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó miền Fc là IgG, cụ thể là miền Fc của IgG₁ hoặc IgG₄.
11. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó miền Fc là miền Fc ở người.
12. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó miền Fc bao gồm việc cải biến thúc đẩy sự liên kết của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc.
13. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm 12, trong đó trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc, gốc axit amin được thay bằng gốc axit amin có thể tích mạch bên lớn hơn, nhờ đó tạo ra chỗ nhô ra trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất mà có thể định vị trong hốc trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai, và trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc, gốc axit amin được thay bằng gốc axit amin có thể tích mạch bên nhỏ hơn, nhờ đó tạo ra hốc trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai trong đó chỗ nhô ra trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất là có thể định vị.
14. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó miền Fc thể hiện ái lực gắn kết với thụ thể Fc giảm và/hoặc chức năng tác động giảm, khi so với miền Fc của IgG₁ tự nhiên.

15. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó miền Fc chứa một hoặc nhiều phần thể axit amin mà làm giảm việc gắn kết với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động.
16. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm 15, trong đó một hoặc nhiều phần thể axit amin đã nêu là ở một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm gồm L234, L235, và P329 (đánh số theo EU).
17. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm 16, trong đó mỗi cấu trúc siêu phân tử của miền Fc chứa ba phần thể axit amin mà làm giảm việc gắn kết với thụ thể Fc hoạt hóa và/hoặc chức năng tác động, trong đó phần thể axit amin đã nêu là L234A, L235A và P329G (đánh số theo EU).
18. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó thụ thể Fc là thụ thể Fc γ .
19. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó chức năng tác động là độ độc hại tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC).
20. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng nguyên hoạt hóa tế bào T là CD3.
21. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng nguyên tế bào đích được chọn từ nhóm gồm: chondroitin sulfat proteoglycan có liên quan đến u melanin (MCSP), thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR), CD19, CD20, CD33, kháng nguyên ung thư phôi (CEA) và protein hoạt hóa nguyên bào sợi – (Fibroblast Activation Protein - FAP).
22. Polynucleotit được phân lập mã hóa cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 21.
23. Phương pháp sản xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 21, phương pháp này bao gồm các bước a) nuôi cấy tế bào chủ chứa polynucleotit được phân lập theo điểm 22 hoặc vectơ chứa polynucleotit được phân lập theo điểm 22, trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T và b) thu hồi phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T.

24. Dược phẩm chứa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 21 và chất mang dược dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Roche Glycart AG

<120> PHÂN TỬ GẮN KẾT KHÁNG NGUYÊN ĐẶC HIỆU KÉP HOẠT HÓA TẾ BÀO T VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PHÂN TỬ NÀY

<130> 31447

<150> EP 13156686.1

<151> 2013-02-26

<160> 122

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 455

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HC CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 1

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr
			20					25					30		

Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			

Ser	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp
	50					55					60				

Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr
65					70					75				80	

Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
				85					90					95	

Tyr	Cys	Val	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe
			100					105					110		

Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
		115					120					125			

22213

Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	130	135	140	
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	145	150	155	160
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	165	170	175	
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	180	185	190	
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	195	200	205	
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	210	215	220	
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	225	230	235	240
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	245	250	255	
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	260	265	270	
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	275	280	285	
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	290	295	300	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	305	310	315	320
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	325	330	335	
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	340	345	350	
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	355	360	365	

22213

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 2
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> LC CD3 CH2527 (VL_7-46(13))
 <400> 2
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 100 105 110

Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
 115 120 125

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
 130 135 140

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
 145 150 155 160

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
 165 170 175

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
 180 185 190

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
 195 200 205

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 3
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VH CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

22213

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR1 CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 4

Thr Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 5
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR2 CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 5

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR3 CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 6

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 7
<211> 109

22213

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> VL CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

 <400> 7

 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30

 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
 35 40 45

 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65 70 75 80

 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR1 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 8

 Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
 1 5 10

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR2 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 9

22213

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))
<400> 10

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
1 5

<210> 11
<211> 442
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HC MCSP M4-3 (C1)\$
<400> 11

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
115 120 125

22213

Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
130						135					140				
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
145					150					155					160
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
				165					170					175	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
			180					185						190	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
		195					200					205			
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
	210					215					220				
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
225					230					235					240
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
				245					250					255	
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
			260					265					270		
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
		275					280					285			
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
	290					295					300				
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
305					310					315					320
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
				325					330					335	
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
			340					345					350		
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
		355					360					365			

22213

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 12
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LC MCSP ML2 (G3)

<400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ala Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH MCSP M4-3 (C1)

<400> 13

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

22213

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 14
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 MCSP M4-3 (C1)

<400> 14

Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn
 1 5

<210> 15
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 MCSP M4-3 (C1)

<400> 15

Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR3 MCSP M4-3 (C1)

<400> 16

Phe Asp Tyr
 1

<210> 17
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VL MCSP ML2 (G3)

<400> 17

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

22213

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ala Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR1 MCSP ML2 (G3)

<400> 18

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 MCSP ML2 (G3)

<400> 19

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3 MCSP ML2 (G3)

22213

<400> 20

Gln Gln Tyr Ser Ala Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 21

<211> 451

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HC CEA CH1A1A 98-99

<400> 21

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

22213

Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
			180					185					190		
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
			195				200					205			
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
	210					215					220				
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
225					230					235					240
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
				245					250					255	
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
			260					265					270		
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
		275					280					285			
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
	290					295					300				
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
305					310					315					320
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
				325					330					335	
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
			340					345					350		
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
		355					360					365			
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
	370					375					380				
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
385					390					395					400
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
				405					410					415	

22213

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 22
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LC CEA 2F1

<400> 22

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 23

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH CEA CH1A1A 98-99

<400> 23

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

22213

<210> 24
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 CEA CH1A1A 98-99

<400> 24

Glu Phe Gly Met Asn
 1 5

<210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 CEA CH1A1A 98-99

<400> 25

Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 26
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR3 CEA CH1A1A 98-99

<400> 26

Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 27
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VL CEA 2F1

<400> 27

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

22213

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR1 CEA 2F1

<400> 28

Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Val Ala
1 5 10

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 CEA 2F1

<400> 29

Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg
1 5

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3 CEA 2F1

22213

<400> 30

His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Phe Thr
1 5 10

<210> 31

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL CD3 CH2527 (VL_7-43(11))

<400> 31

Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser
100 105 110

<210> 32

<211> 125

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH CD3 CH2527 (VHcomboA49SV93A)

<400> 32

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 33

<211> 125

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH CD3 CH2527 (VHcomboA49SV93AR94K)

<400> 33

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

22213

Tyr Cys Ala Lys His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 34
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VH MCSP M4-3 (D6)

<400> 34

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Lys Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 MCSP M4-3 (D6)

<400> 35

Ile Thr Phe Asp Gly Lys Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

22213

<210> 36
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VH MCSP M4-3 (A7)

<400> 36

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Asp Gly
 20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Arg Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 37
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 MCSP M4-3 (A7)

<400> 37

Asp Gly Tyr Tyr Trp Asn
 1 5

<210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 MCSP M4-3 (A7)

22213

<400> 38

Ile Thr Phe Asp Gly Arg Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 39

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH MCSP M4-3 (B7)

<400> 39

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ile Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 MCSP M4-3 (B7)

<400> 40

Ile Thr Phe Asp Gly Ile Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 41

<211> 112

22213

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VH MCSP M4-3 (B8)

<400> 41

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Arg Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 42
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VH MCSP M4-3

<400> 42

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

22213

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 43
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VL MCSP ML2 (E10)

<400> 43

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Tyr Gly Ile Arg Gly Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR1 MCSP ML2 (E10)

<400> 44

Arg Ala Ser Tyr Gly Ile Arg Gly Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR3 MCSP ML2 (E10)

<400> 45

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr
 1 5

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL MCSP ML2 (E10-G3)

<400> 46

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Tyr Gly Ile Arg Gly Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Tyr Ser Ala Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 47

<211> 107

22213

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VL MCSP ML2 (C5)

<400> 47

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Gly Ile Arg Glu Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Gly Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Glu Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 48
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR1 MCSP ML2 (C5)

<400> 48

Arg Ala Ser Arg Gly Ile Arg Glu Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 MCSP ML2 (C5)

<400> 49

22213

Tyr Thr Gly Ser Leu His Ser
1 5

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3 MCSP ML2 (C5)

<400> 50

Gln Gln Tyr Ser Glu Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 51
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VL MCSP ML2 (C5-G3)

<400> 51

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Gly Ile Arg Glu Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Gly Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ala Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 52
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

22213

<220>

<223> VL MCSP ML2

<400> 52

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 53

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)

<400> 53

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

22213

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
100 105 110

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
115 120 125

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
130 135 140

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
145 150 155 160

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
180 185 190

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
195 200 205

Val Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 54
<211> 685
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MCSP M4-3 (C1) (VH-CH1) - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc(phần
phình)
P329GLALA

<400> 54

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

22213

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 130 135 140
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 180 185 190
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 195 200 205
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 210 215 220
 Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 225 230 235 240
 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 245 250 255
 Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 260 265 270

22213

Trp	Val	Ser	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr
		275					280					285			
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys
	290					295					300				
Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala
305					310					315					320
Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Val	Ser
				325					330					335	
Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala
			340					345					350		
Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln
		355					360					365			
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr
	370					375					380				
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser
385					390					395					400
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr
				405					410					415	
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys
			420					425					430		
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro
		435					440					445			
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys
	450					455					460				
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
465					470					475					480
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
				485				490						495	
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys
			500					505					510		

22213

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 515 520 525

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 530 535 540

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 545 550 555 560

Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 565 570 575

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys
 580 585 590

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
 595 600 605

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 610 615 620

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 625 630 635 640

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 645 650 655

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 660 665 670

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 675 680 685

<210> 55
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MCSP M4-3 (C1) (VH-CH1) - Fc(phần lõm) P329GLALA

<400> 55

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 130 135 140
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 180 185 190
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 195 200 205
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 210 215 220
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 225 230 235 240
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 245 250 255
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
340 345 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 56
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)

<400> 56

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

22213

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
 100 105 110
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 115 120 125
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 130 135 140
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 180 185 190
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 195 200 205
 Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210

<210> 57

<211> 694

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CEA CH1A1A 98/99 - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc(phần phình)
P329GLALA

<400> 57

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu

22213

225						230										235						240
Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser							
				245					250					255								
Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	Ala	Met	Asn	Trp	Val							
			260					265					270									
Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Arg	Ile	Arg	Ser							
		275					280					285										
Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg							
	290					295					300											
Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met							
305					310					315					320							
Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	His							
				325					330					335								
Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln							
			340					345					350									
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val							
		355					360					365										
Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser							
	370					375					380											
Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln							
385					390					395					400							
Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val							
				405					410					415								
Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu							
			420					425					430									
Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu							
		435					440					445										
Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg							
	450					455					460											
Gly	Glu	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu							

22213

465		470		475		480									
Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
				485					490					495	
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
			500					505					510		
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
		515					520					525			
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
	530					535					540				
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
545					550					555					560
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly
				565					570					575	
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
			580					585					590		
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn
		595					600					605			
Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
	610					615					620				
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
625					630					635					640
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
				645					650					655	
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
			660					665					670		
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
		675					680					685			
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
	690														

<210> 58

22213

<211> 451
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CEA CH1A1A 98/99 (VH-CH1) - Fc(phần lõm) P329GLALA

<400> 58

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

22213

Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
210						215					220				
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly
225					230					235					240
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
				245					250					255	
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
			260					265					270		
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
	275						280					285			
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
	290					295					300				
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
305					310					315					320
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile
				325					330					335	
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
			340					345					350		
Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
		355					360					365			
Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
370						375					380				
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
385					390					395					400
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
				405					410					415	
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
			420					425					430		
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
		435					440					445			

Pro Gly Lys
450

<210> 59
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LC DP47 GS

<400> 59

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

22213

180

185

190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 60
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)

<400> 60

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
 100 105 110

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 115 120 125

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 130 135 140

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
180 185 190

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
195 200 205

Val Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 61

<211> 688

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DP47 GS (VH-CH1) - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc(phần phình)
P329GLALA

<400> 61

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

22213

Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val
130						135					140				
Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala
145					150					155					160
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly
				165					170					175	
Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly
			180					185					190		
Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys
		195					200					205			
Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
	210					215					220				
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu
225					230					235					240
Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe
				245					250					255	
Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys
			260					265					270		
Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ala
		275					280					285			
Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp
	290					295					300				
Asp	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu
305					310					315					320
Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser
				325					330					335	
Tyr	Val	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
			340					345					350		
Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser
		355					360					365			

22213

Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	
370						375					380					
Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	
385					390					395					400	
Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	
				405					410					415		
Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	
			420					425					430			
Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	
		435					440					445				
Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Asp	Lys	Thr	
	450					455					460					
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	
465					470					475					480	
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
				485					490					495		
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	
			500					505					510			
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
		515					520					525				
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	
	530					535					540					
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
545					550					555					560	
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	
				565					570					575		
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	
			580					585					590			
Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	
		595					600					605				

22213

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 610 615 620

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 625 630 635 640

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 645 650 655

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 660 665 670

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 675 680 685

<210> 62
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> DP47 GS (VH-CH1) - Fc(phần lõm) P329GLALA

<400> 62

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 63
<211> 1365
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HC CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 63
gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60
agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacgcc tgaactgggt gcgccaggcc 120
cctggcaaag gcctggaatg ggtgtcccgg atcagaagca agtacaacaa ctacgccacc 180
tactacgccg acagcgtgaa gggccgggtt accatcagcc gggacgacag caagaacacc 240
ctgtacctgc agatgaacag cctgcggggc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtgcgg 300
cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgctt actggggcca gggcaccctc 360
gtgaccgtgt catctgctag caccaagggc ccatcgggtt tccccctggc accctcctcc 420
aagagcacct ctggggggcac agcgggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 480
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 540
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 600
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 660
aagaaagtgt agcccaaadc ttgtgacaaa actcacacat gccaccgtg ccagcacct 720
gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc tttcccccaa aaccaagga caccctcatg 780
atctcccgga ccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agacctgag 840
gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 900

22213

gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac	960
tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc	1020
gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc	1080
ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc	1140
tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag	1200
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tctttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg	1260
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg	1320
cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaa	1365

<210> 64
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LC CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 64	
caggccgtcg tgaccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg	60
acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa	120
aagcccgggc aggcccttcag aggactgac ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc	180
cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc	240
cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggg acagcaacct gtgggtgttc	300
ggcggaggca ccaagctgac agtcctaggt caaccaagg ctgccccag cgtgaccctg	360
ttcccccca gcagcgagga actgcaggcc aacaaggcca ccctgggtctg cctgatcagc	420
gacttctacc caggcgccgt gaccgtggcc tggaaggccg acagcagccc cgtgaaggcc	480
ggcgtggaga ccaccacccc cagcaagcag agcaacaaca agtacgccgc cagcagctac	540
ctgagcctga cccccagca gtggaagagc cacaggtcct acagctgcca ggtgaccac	600
gagggcagca ccgtggagaa aaccgtggcc cccaccgagt gcagc	645

<210> 65
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VH CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 65	
gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg	60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc acctacgcc tgaactgggt gcgccaggcc 120
 cctggcaaag gcctggaatg ggtgtcccgg atcagaagca agtacaacaa ctacgccacc 180
 tactacgcg acagcgtgaa gggccgggtt accatcagcc gggacgacag caagaacacc 240
 ctgtacctgc agatgaacag cctgcggggc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtgcgg 300
 cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcacccctc 360
 gtgaccgtgt catct 375

<210> 66
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 66
 acctacgcc tgaac 15

<210> 67
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 67
 cggatcagaa gcaagtacaa caactacgcc acctactacg ccgacagcgt gaagggc 57

<210> 68
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR3 CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 68
 cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct ac 42

<210> 69
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VL CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 69
 caggcgtcg tgaccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60

acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120
 aagccccggcc aggccttcag aggactgac ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180
 cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc 240
 cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300
 ggcgaggga ccaagctgac agtccta 327

<210> 70
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR1 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 70
 ggcagttcta caggcgccgt gaccaccagc aactacgcca ac 42

<210> 71
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR2 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 71
 ggcaccaaca agagagcccc t 21

<210> 72
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR3 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 72
 gccctgtggt acagcaacct gtgggtg 27

<210> 73
 <211> 1326
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HC MCSP M4-3 (C1)

<400> 73
 caggtgcaat tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60
 acctgcaccg tgtccggcgg cagcatcacc agcggctatt attggaactg gattcggcag 120

cacccccggca agggcctgga atggatcggc tacatcactt tcgacggctc taacaactac	180
aaccccagcc tgaagtccag agtgaccatc agccgggaca ccagcaagaa ccagttcagc	240
ctgaagctgt ccagcgtgac agccgccgac accgccgtgt actactgcg cgaacttcgac	300
tactggggcc agggcaccct ggtcacctg tccagcgcta gcaccaaggg cccatcggtc	360
ttccccctgg caccctctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggctgcctg	420
gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcg cctgaccagc	480
ggcgtgcaca ccttccccgc tgtcctacag tctcaggac tctactccct cagcagcgtg	540
gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaa	600
cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt gagcccaa at cttgtgacaa aactcacaca	660
tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttct cttcccccca	720
aaaccaagg acaccctcat gatctcccg acccctgagg tcacatgct ggtggtggac	780
gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat	840
aatgccaaga caaagccg cgaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc	900
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtcaa ggtctccaac	960
aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccagaa	1020
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg	1080
acctgcctgg tcaaaggctt ctatccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg	1140
cagccggaga acaactacaa gaccacgct cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc	1200
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc	1260
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctct cctgtctccg	1320
ggtaaa	1326

<210> 74
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LC MCSP ML2 (G3)

<400> 74	
gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca cagagtgacc	60
atcacctgcc gggccagcca gggcatccgg aactacctga actggtatca gcagaagccc	120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagcc tgcacagcgg cgtgcctagc	180
cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccattagctc cctgcagccc	240

22213

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tactctgctc tgccgtggac cttcgggcag 300
 ggaacaaagg tggagatcaa gcgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 75
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VH MCSP M4-3 (C1)

<400> 75
 caggtgcaat tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60
 acctgcaccg tgtccggcgg cagcatcacc agcggctatt attggaactg gattcggcag 120
 caccgccgca agggcctgga atggatcggc tacatcactt tcgacggctc taacaactac 180
 aaccccagcc tgaagtccag agtgaccatc agccgggaca ccagcaagaa ccagttcagc 240
 ctgaagctgt ccagcgtgac agccgccgac accgccgtgt actactgcgc cgacttcgac 300
 tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtg tccagc 336

<210> 76
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR1 MCSP M4-3 (C1)

<400> 76
 agcggctatt attggaac 18

<210> 77
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR2 MCSP M4-3 (C1)

<400> 77
 tacatcactt tcgacggctc taacaactac aaccccagcc tgaagtcc 48

<210> 78
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCDR3 MCSP M4-3 (C1)

<400> 78
 ttcgactac

9

<210> 79
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VL MCSP ML2 (G3)

<400> 79
 gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60
 atcacctgcc gggccagcca gggcatccgg aactacctga actggtatca gcagaagccc 120
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagcc tgcacagcgg cgtgcctagc 180
 cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccattagctc cctgcagccc 240
 gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tactctgctc tgccgtggac cttcggccag 300
 ggaacaaagg tggagatcaa g 321

<210> 80
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR1 MCSP ML2 (G3)

<400> 80
 cggggccagcc agggcatccg gaactacctg aac

33

<210> 81
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR2 MCSP ML2 (G3)

<400> 81
 tacaccagca gcctgcacag c

21

22213

<210> 82
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCDR3 MCSP ML2 (G3)

<400> 82
 cagcagtact ctgctctgcc gtggacc

27

<210> 83
 <211> 1353
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HC CEA CH1A1A 98-99

<400> 83
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg 60
 tcttgcaagg ccagcgggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120
 ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
 gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240
 atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300
 ttgcctatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
 agcgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct 420
 gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg 480
 tctgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540
 tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600
 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660
 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 720
 ggaccgtcag tottctctct cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc 780
 cctgaggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840
 tgggtacgtg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac 900
 aacagcacgt accgtgtggg cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960
 aaggagtaca agtgcaagggt ctccaacaaa gccctccag ccccatcga gaaaaccatc 1020
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca cctgcccc atcccgggat 1080
 gagctgacca agaaccagggt cagcctgacc tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac caccgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttctctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 84
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LC CEA 2F1

<400> 84
 gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtc ggctgtgggt acgtatgttg cgtgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcctcctacc gcaaaagggg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caagcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
 tatccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 540
 acgtgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
 ggctgagct cggcgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 85
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VH CEA CH1A1A 98-99

<400> 85
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaagggtg 60
 tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120
 ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
 gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240
 atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300
 ttgcctatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360

agc	363
<210> 86	
<211> 15	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> HCDR1 CEA CH1A1A 98-99	
<400> 86	
gagttcggca tgaac	15
<210> 87	
<211> 51	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> HCDR2 CEA CH1A1A 98-99	
<400> 87	
tggatcaaca ccaagaccgg cgaggccacc tacgtggaag agttcaaggg c	51
<210> 88	
<211> 36	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> HCDR3 CEA CH1A1A 98-99	
<400> 88	
tgggacttcg cctattacgt ggaagccatg gactac	36
<210> 89	
<211> 324	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> VL CEA 2F1	
<400> 89	
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc	60
atcacttgca aggccagtgc ggctgtgggt acgtatgttg cgtgggtatca gcagaaacca	120
gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcacccatcc gcaaaagggg agtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc	300
cagggcacca agctcgagat caag	324

<210> 90
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> LCDR1 CEA 2F1

 <400> 90
 aaggccagtg cggctgtggg tacgtatgtt gcg 33

 <210> 91
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> LCDR2 CEA 2F1

 <400> 91
 tcggcatcct accgcaaaag g 21

 <210> 92
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> LCDR3 CEA 2F1

 <400> 92
 caccaatatt acacctatcc tctattcacg 30

 <210> 93
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)

 <400> 93
 caggccgtcg tgaccacagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60
 acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120
 aagcccggcc aggccttcag aggactgata ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180
 cctgccagat tcagcggata tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc 240
 cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300
 ggcggaggca ccaagctgac agtgctgagc agcgcttcca ccaaaggccc ttccgtgttt 360
 cctctggctc ctagctccaa gtccacctct ggaggcacccg ctgctctcgg atgcctcgtg 420

aaggattatt ttcttgagcc tgtgacagtg tcctggaata gcggagcact gacctctgga 480
 gtgcatactt tccccgctgt gctgcagtcc tctggactgt acagcctgag cagcgtggtg 540
 acagtgccca gcagcagcct gggcaccag acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc 600
 agcaacacca aggtggacaa gaaggtggaa cccaagtctt gt 642

<210> 94

<211> 2055

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MCSP M4-3 (C1) (VH-CH1) - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc(phần
 phình)

P329GLALA

<400> 94

caggtgcaat tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60
 acctgcaccg tgtccggcgg cagcatcacc agcggctatt attggaactg gattcggcag 120
 cccccggca agggcctgga atggatcggc tacatcactt tcgacggctc taacaactac 180
 aaccccagcc tgaagtccag agtgaccatc agccgggaca ccagcaagaa ccagttcagc 240
 ctgaagctgt ccagcgtgac agccgccgac accgccgtgt actactgcgc cgacttcgac 300
 tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtg tcagcgcta gcacaaaggg cccagcgtg 360
 ttccctctgg ccctagcag caagagcaca tctggcggaa cagccgccct gggctgcctc 420
 gtgaaggact actttccga gcctgtgacc gtgtcctgga actctggcgc cctgacaagc 480
 ggcgtcaca cttttccagc cgtgctgcag agcagcggcc tgtactctct gagcagcgtg 540
 gtcaccgtgc ctagcagcag cctgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag 600
 cccagcaaca ccaaagtgga caagaaggtg gagcccaaga gctgtgatgg cggaggaggg 660
 tccggaggcg gaggatccga ggtgcagctg ctggaatctg gcggcggact ggtgcagcct 720
 ggcggatctc tgagactgag ctgtgccgcc agcggcttca ctttcagcac ctacgccatg 780
 aactgggtgc gccaggcccc tggcaaaggc ctggaatggg tgtcccggat cagaagcaag 840
 tacaacaact acgccaccta ctacgccgac agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg 900
 gacgacagca agaacaccct gtacctgcag atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc 960
 gtgtactatt gtgtgcggca cggcaacttc ggcaacagct atgtgtcttg gtttgcctac 1020
 tggggccagg gcaccctcgt gaccgtgtca agcgetagcg tggccgctcc ctccgtgttt 1080
 atctttcccc catccgatga acagctgaaa agcggcaccg cctccgtcgt gtgtctgctg 1140
 aacaattttt accctagga agctaaagtg cagtggaaag tggataacgc actgcagtcc 1200

```

ggcaactccc aggaatctgt gacagaacag gactccaagg acagcaccta ctccctgtcc 1260
tccaccctga cactgtctaa ggctgattat gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 1320
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgtgacaag 1380
acccacacct gtcccccttg tctgccccct gaagctgctg gcggcccttc tgtgttcctg 1440
ttccccccaa agcccaagga caccctgatg atcagccgga ccccggaagt gacctgcgtg 1500
gtggtggatg tgtccacga ggacctgaa gtgaagttca attggtacgt ggacggcgtg 1560
gaagtgcaca acgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 1620
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag 1680
gtctccaaca aagccctcgg cgcgcccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1740
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag 1800
gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1860
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1920
tcctttcttc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1980
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 2040
ctgtctccgg gtaaa 2055

```

<210> 95
<211> 1326
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MCSP M4-3 (C1) (VH-CH1) - Fc(phần lõm) P329GLALA

```

<400> 95
caggtgcaat tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60
acctgcaccg tgtccggcgg cagcatcacc agcggctatt attggaactg gattcggcag 120
caccccgga agggcctgga atggatcggc tacatcactt tcgacggctc taacaactac 180
aaccocagcc tgaagtccag agtgaccatc agccgggaca ccagcaagaa ccagttcagc 240
ctgaagctgt ccagcgtgac agccgccgac accgcctgt actactgcgc cgacttcgac 300
tactggggcc agggcacctt ggtcacctg tccagcgcta gcaccaaggg cccctccgtg 360
ttccccctgg cccocagcag caagagcacc agcggcggca cagccgctct gggctgcctg 420
gtcaaggact acttccccga gcccgtagc gtgtcctgga acagcggagc cctgacctcc 480
ggcgtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag agttctggcc tgtatagcct gagcagcgtg 540
gtcaccgtgc cttctagcag cctgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag 600

```

```

cccagcaaca ccaaggtgga caagaaggtg gagcccaaga gctgcgacaa aactcacaca      660
tgcccaccgt gccagcacc tgaagctgca gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca      720
aaaccaaggg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac      780
gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat      840
aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc      900
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac      960
aaagccctcg gcgcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa    1020
ccacaggtgt gcaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctc    1080
tcgtgcgag tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg    1140
cagccggaga acaactacaa gaccacgct cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc      1200
ctcgtgagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc      1260
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg      1320
ggtaaa                                           1326

```

```

<210> 96
<211> 642
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)

```

```

<400> 96
caggccgtcg tgaccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg      60
acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa      120
aagcccggcc aggccttcag aggactgac ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc      180
cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc      240
cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc      300
ggcggaggca ccaagctgac agtgctgagc agcgcttcca ccaaaggccc ttccgtgttt      360
cctctggctc ctagctccaa gtccacctct ggaggcaccg ctgctctcgg atgcctcgtg      420
aaggattatt ttctgagcc tgtgacagtg tctggaata gcggagcact gacctctgga      480
gtgcatactt tccccgtgt gctgcagtcc tctggactgt acagcctgag cagcgtggtg      540
acagtgccca gcagcagcct gggcaccag acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc      600
agcaacacca aggtggacaa gaaggtggaa cccaagtctt gt                                           642

```

<210> 97
 <211> 2082
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CEA CH1A1A 98/99 - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc(phần phình)
 P329GLALA

<400> 97

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccag cgtgaagggtg      60
tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggcc      120
cctggacagg gcctggaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac      180
gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accaccgaca ccagcaccag caccgcctac      240
atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac      300
ttcgctact atgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct      360
agtgctagca caaagggccc cagcgtgttc cctctggccc ctagcagcaa gagcacatct      420
ggcggaacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact ttcccgagcc cgtgacagtg      480
tcctggaact ctggcgccct gacaagcggc gtgcacacct ttccagccgt gctgcagagc      540
agcggcctgt actctctgag cagcgtggtc accgtgccta gctctagcct gggcaccag      600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggaa      660
cccaagagct gcgatggcgg agggggctcc ggaggcggag gatccgaggt gcagctgctg      720
gaatctggcg gcggactggt gcagcctggc ggatctctga gactgagctg tgccgccagc      780
ggcttcacct tcagcaccta cgccatgaac tgggtgcgcc agggccctgg caaaggcctg      840
gaatgggtgt cccggatcag aagcaagtac aacaactacg ccacctacta cgccgacagc      900
gtgaagggcc ggttcacat cagccgggac gacagcaaga acaccctgta cctgcagatg      960
aacagcctgc gggccgagga caccgccgtg tactattgtg tgccggcacgg caacttcggc     1020
aacagctatg tgtcttggtt tgctactggg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtcaagc     1080
gctagcgtgg ccgtccctc cgtgtttatc tttcccccat ccgatgaaca gctgaaaagc     1140
ggcaccgcct ccgtcgtgtg tctgctgaac aatTTTTacc ctagggaagc taaagtgcag     1200
tggaaagtgg ataacgcact gcagtccggc aactccagag aatctgtgac agaacaggac     1260
tccaaggaca gcacctactc cctgtcctcc accctgacac tgtctaaggc tgattatgag     1320
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag     1380
agcttcaaca ggggagagtg tgacaagacc cacacctgtc ccccttgtcc tgcccctgaa     1440
gctgctggcg gcccttctgt gttcctgttc cccccaaagc ccaaggacac cctgatgata     1500

```


agccggaccc ccgaagtgac ctgctgtggtg gtggatgtgt cccacgagga ccctgaagtg 1560
 aagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa gtgcacaacg ccaagacaaa gccgcgggag 1620
 gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 1680
 ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcggcgc ccccatcgag 1740
 aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1800
 tgccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgtggt gcctgggtcaa aggccttctat 1860
 cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1920
 acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctctt acagcaagct caccgtggac 1980
 aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 2040
 aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 2082

<210> 98
 <211> 1353
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CEA CH1A1A 98/99 (VH-CH1) - Fc(phần lõm) P329GLALA

<400> 98
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaagggtg 60
 tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120
 ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
 gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240
 atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300
 ttgcctatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
 agcgttagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420
 ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480
 tcctggaaca ggggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540
 tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcaccag 600
 acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660
 cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720
 ggaccgtcag tcttctcttt cccccaaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctccccgacc 780
 cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840
 tgggtacgtg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagacaa agccgcggga ggagcagtag 900

22213

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	960
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg ccccatcga gaaaaccatc	1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgcccc atcccgggat	1080
gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac	1140
atgcgcgtgg agtgaggag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc	1200
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac	1320
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa	1353

<210> 99
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LC DP47 GS

<400> 99	
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcttgca gggccagtca gagtggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct gacgttcggc	300
caggggacca aagtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttccc	360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc	420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc	480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg	540
acgtgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag	600
ggcctgagct cggccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt	645

<210> 100
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)

<400> 100	
caggccgtcg tgaccagga accagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg	60

acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120
 aagccccggc aggcccttcag aggactgac ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180
 cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc 240
 cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300
 ggcgaggca ccaagctgac agtgctgagc agcgcttcca ccaaaggccc ttccgtgttt 360
 cctctggctc ctagctccaa gtccacctct ggaggcaccg ctgctctcgg atgcctcgtg 420
 aaggattatt ttcttgagcc tgtgacagtg tcttgaata gcggagcact gacctctgga 480
 gtgcatactt tccccgtgt gctgcagtcc tctggactgt acagcctgag cagcgtggtg 540
 acagtgccca gcagcagcct gggcaccag acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc 600
 agcaacacca aggtggacaa gaaggtggaa cccaagtctt gt 642

<210> 101

<211> 2064

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DP47 GS (VH-CH1) - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc(phần phình)
P329GLALA

<400> 101

gaggtgcaat tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcc tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg ggctggagt ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300
 ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag cacaaggggc 360
 cccagcgtgt tccctctggc ccctagcagc aagagcacat ctggcggaac agccgccctg 420
 ggctgcctcg tgaaggacta ctttcccgag cctgtgaccg tgtcctggaa ctctggcgcc 480
 ctgacaagcg gcgtgcacac ctttccagcc gtgctgcaga gcagcggcct gtactctctg 540
 agcagcgtgg tcaccgtgcc tagcagcagc ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
 aaccacaagc ccagcaacac caaagtggac aagaaggtgg agcccaagag ctgtgatggc 660
 ggaggagggt ccggaggcgg aggatccgag gtgcagctgc tggaatctgg cggcggaactg 720
 gtgcagcctg gcggatctct gagactgagc tgtgccgcca gcggcttcac cttcagcacc 780
 tacgccatga actgggtgcg ccaggcccct ggcaaaggcc tggaatgggt gtcccggatc 840
 agaagcaagt acaacaacta cgccacctac tacgccgaca gcgtgaaggg ccggttcacc 900

atcagccggg acgacagcaa gaacaccctg tacctgcaga tgaacagcct gcgggcccag 960
 gacaccgccg tgtactattg tgtgcggcac ggcaacttcg gcaacagcta tgtgtcttgg 1020
 ttgtcctact gggggccagg caccctcgtg accgtgtcaa gcgctagcgt ggccgctccc 1080
 tccgtgttta tctttccccc atccgatgaa cagctgaaaa gcggcaccgc ctccgtcgtg 1140
 tgtctgctga acaattttta ccctagggaa gctaaagtgc agtggaagt ggataacgca 1200
 ctgcagtcct gcaactccca ggaatctgtg acagaacagg actccaagga cagcacctac 1260
 tccctgtcct ccaccctgac actgtctaag gctgattatg agaaacacaa agtctacgcc 1320
 tgccaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacia agagcttcaa caggggagag 1380
 tgtgacaaga cccacacctg tcccccttgt cctgccccctg aagctgctgg cggcccttct 1440
 gtgttctctg tccccccaaa gcccaaggac accctgatga tcagccggac ccccgaagtg 1500
 acctgcgtgg tgggtggatgt gtccacagag gaccctgaag tgaagttcaa ttggtacgtg 1560
 gacggcgtgg aagtgcacia cgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 1620
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1680
 aagtgcagg tctccaacia agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctcaaagcc 1740
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catgccggga tgagctgacc 1800
 aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catgcgcgtg 1860
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1920
 tccgaaggct ccttcttct ctacagcaag ctaccctgg acaagagcag gtggcagcag 1980
 gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cagcagaag 2040
 agcctctccc tgtctccggg taaa 2064

<210> 102

<211> 1335

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> DP47 GS (VH-CH1) - Fc(phần lõm) P329GLALA

<400> 102

gaggtgcaat tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300

```

ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc      360
ccctccgtgt tccccctggc cccagcagc aagagcacca gcggcggcac agccgctctg      420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggagcc      480
ctgacctccg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gttctggcct gtatagcctg      540
agcagcgtgg tcaccgtgcc ttctagcagc ctggggcacc agacctacat ctgcaacgtg      600
aaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaggtgg agcccaagag ctgcgacaaa      660
actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttctc      720
ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg      780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg      840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg      900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag      960
gtctccaaca aagccctcgg cgtccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag     1020
ccccgagaac cacaggtgtg caccctgcc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag     1080
gtcagcctct cgtgcgcagt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag     1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc     1200
tccttcttcc tcgtgagcaa gctcacctg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc     1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc     1320
ctgtctccgg gtaaa                                           1335

```

<210> 103
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 103

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
 1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
 20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
 35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
 50 55 60

22213

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
115 120 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195 200 205

<210> 104

<211> 198

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 104

Met Gln Ser Gly Thr Arg Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

Ile Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr
20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Gln Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45

Cys Ser Gln His Leu Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys
50 55 60

22213

Asn Lys Glu Asp Ser Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu
65 70 75 80

Met Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro
85 90 95

Glu Asp Ala Ser His His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn
100 105 110

Cys Met Glu Met Asp Val Met Ala Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp
115 120 125

Ile Cys Ile Thr Leu Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys
130 135 140

Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly
145 150 155 160

Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn
165 170 175

Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly
180 185 190

Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195

<210> 105
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> linker

<400> 105

Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 106
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> linker

<400> 106

22213

Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 107

<211> 227

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195

200

205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

<210> 108
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> peptit dẫn

<400> 108

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 109
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> peptit dẫn

<400> 109
 atggactgga cctggagaat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

<210> 110
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> peptit dẫn

<400> 110
 atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

<210> 111
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> peptit dẫn

<400> 111

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys
20

<210> 112

<211> 66

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> peptit dẫn

<400> 112

atggacatga gggccccgc tcagctctcg ggctctctgc tgctctgggt cccaggtgcc 60

aggtgt 66

<210> 113

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> peptit dẫn

<400> 113

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 114

<211> 57

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> peptit dẫn

<400> 114

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattcc 57

<210> 115

<211> 57

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> peptit dẫn

<400> 115

atgggctggg cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccactggagt gcattcc

57

<210> 116

<211> 57

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> peptit dẫn

<400> 116

atgggctggg cctgcatcat cctgtttctg gtcgccacag ccaccggcgt gcactct

57

<210> 117

<211> 643

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 117

Leu	Ser	Leu	Glu	Gly	Ser	Arg	Thr	Leu	Thr	Val	Cys	Pro	Gly	Ser	Val
1				5					10					15	

Gln	Pro	Leu	Ser	Ser	Gln	Thr	Leu	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Ala	Gly	Thr
			20					25					30		

Asp	Pro	Gln	Leu	Leu	Leu	Tyr	Arg	Val	Val	Arg	Gly	Pro	Gln	Leu	Gly
		35					40					45			

Arg	Leu	Phe	His	Ala	Gln	Gln	Asp	Ser	Thr	Gly	Glu	Ala	Leu	Val	Asn
	50					55					60				

Phe	Thr	Gln	Ala	Glu	Val	Tyr	Ala	Gly	Asn	Ile	Leu	Tyr	Glu	His	Glu
65					70				75					80	

Met	Pro	Thr	Glu	Pro	Phe	Trp	Glu	Ala	His	Asp	Thr	Leu	Glu	Leu	Gln
				85					90					95	

Leu	Ser	Ser	Pro	Pro	Ala	Arg	Asp	Val	Ala	Ala	Thr	Leu	Ala	Val	Ala
			100					105					110		

Val	Ser	Phe	Glu	Ala	Ala	Cys	Pro	Gln	Arg	Pro	Ser	His	Leu	Trp	Lys
		115					120					125			

Asn	Lys	Gly	Leu	Trp	Val	Pro	Glu	Gly	Gln	Arg	Ala	Lys	Ile	Thr	Met
	130					135					140				

Ala Ala Leu Asp Ala Ser Asn Leu Leu Ala Ser Val Pro Ser Pro Gln
 145 150 155 160

Arg Leu Glu His Asp Val Leu Phe Gln Val Thr Gln Phe Pro Ser Arg
 165 170 175

Gly Gln Leu Leu Val Ser Glu Glu Pro Leu His Ala Gly Gln Pro His
 180 185 190

Phe Leu Gln Ser Gln Leu Ala Ala Gly Gln Leu Val Tyr Ala His Gly
 195 200 205

Gly Gly Gly Thr Gln Gln Asp Gly Phe His Phe Arg Ala His Leu Gln
 210 215 220

Gly Pro Ala Gly Ala Thr Val Ala Gly Pro Gln Thr Ser Glu Ala Phe
 225 230 235 240

Ala Ile Thr Val Arg Asp Val Asn Glu Arg Pro Pro Gln Pro Gln Ala
 245 250 255

Ser Val Pro Leu Arg Ile Thr Arg Gly Ser Arg Ala Pro Ile Ser Arg
 260 265 270

Ala Gln Leu Ser Val Val Asp Pro Asp Ser Ala Pro Gly Glu Ile Glu
 275 280 285

Tyr Glu Val Gln Arg Ala Pro His Asn Gly Phe Leu Ser Leu Val Gly
 290 295 300

Gly Gly Pro Gly Pro Val Thr His Phe Thr Gln Ala Asp Val Asp Ser
 305 310 315 320

Gly Arg Leu Ala Phe Val Ala Asn Gly Ser Ser Val Ala Gly Val Phe
 325 330 335

Gln Leu Ser Met Ser Asp Gly Ala Ser Pro Pro Leu Pro Met Ser Leu
 340 345 350

Ala Val Asp Ile Leu Pro Ser Ala Ile Glu Val Gln Leu Gln Ala Pro
 355 360 365

Leu Glu Val Pro Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ser Gln Gln Gln
 370 375 380

Leu Arg Val Val Ser Asp Arg Glu Glu Pro Glu Ala Ala Tyr Arg Leu
385 390 395 400

Ile Gln Gly Pro Lys Tyr Gly His Leu Leu Val Gly Gly Arg Pro Ala
405 410 415

Ser Ala Phe Ser Gln Leu Gln Ile Asp Gln Gly Glu Val Val Phe Ala
420 425 430

Phe Thr Asn Phe Ser Ser Ser His Asp His Phe Arg Val Leu Ala Leu
435 440 445

Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Ala Val Val Asn Ile Thr Val Arg Ala
450 455 460

Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly Ala Thr Leu
465 470 475 480

Arg Leu Asp Pro Thr Ile Leu Asp Ala Gly Glu Leu Ala Asn Arg Thr
485 490 495

Gly Ser Val Pro His Phe Arg Leu Leu Glu Gly Pro Arg His Gly Arg
500 505 510

Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu Pro Gly Gly Ser Gln Leu
515 520 525

Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu Glu Asp Gly Arg Leu Gly Leu
530 535 540

Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg Ala Pro Ser Pro Thr Gly Asp Ser
545 550 555 560

Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala Gln Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Ser
565 570 575

Leu Asp Phe Ala Thr Glu Pro Tyr Asn Ala Ala Arg Pro Tyr Ser Val
580 585 590

Ala Leu Leu Ser Val Pro Glu Ala Thr Arg Met Glu Ala Gly Lys Pro
595 600 605

Glu Ser Ser Thr Pro Thr Gly Glu Pro Gly Pro Met Ala Ser Ser Pro
610 615 620

Val Pro Ala Val Ala Lys Gly Gly Phe Leu Gly Phe Leu Glu Ala Asn
 625 630 635 640

Met Phe Ser

<210> 118
 <211> 643
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 118

Leu Ser Leu Lys Gly Ser Gln Thr Leu Thr Val Cys Pro Gly Ser Val
 1 5 10 15

Gln Pro Leu Ser Ser Gln Thr Leu Arg Ala Ser Ser Ser Ala Gly Thr
 20 25 30

Asp Pro Gln Leu Leu Leu Tyr Arg Val Val Arg Gly Pro Gln Leu Gly
 35 40 45

Arg Leu Phe His Ala Gln Gln Asp Ser Thr Gly Glu Ala Leu Val Asn
 50 55 60

Phe Thr Gln Ala Glu Val Tyr Ala Gly Asn Ile Leu Tyr Glu His Glu
 65 70 75 80

Met Pro Pro Glu Pro Phe Trp Glu Ala His Asp Thr Leu Glu Leu Gln
 85 90 95

Leu Ser Ser Pro Pro Ala Arg Asp Val Ala Ala Thr Leu Ala Val Ala
 100 105 110

Val Ser Phe Glu Ala Ala Cys Pro Gln His Pro Ser His Leu Trp Lys
 115 120 125

Asn Lys Gly Leu Trp Val Pro Glu Gly Gln Arg Ala Arg Ile Thr Val
 130 135 140

Ala Ala Leu Asp Ala Ser Asn Leu Leu Ala Ser Val Pro Ser Pro Gln
 145 150 155 160

Arg Ser Glu His Asp Val Leu Phe Gln Val Thr Gln Phe Pro Ser Arg
 165 170 175

Gly Gln Leu Leu Val Ser Glu Glu Pro Leu His Ala Gly Gln Pro His
 180 185 190

Phe Leu Gln Ser Gln Leu Ala Ala Gly Gln Leu Val Tyr Ala His Gly
 195 200 205

Gly Gly Gly Thr Gln Gln Asp Gly Phe His Phe Arg Ala His Leu Gln
 210 215 220

Gly Pro Ala Gly Ala Ser Val Ala Gly Pro Gln Thr Ser Glu Ala Phe
 225 230 235 240

Ala Ile Thr Val Arg Asp Val Asn Glu Arg Pro Pro Gln Pro Gln Ala
 245 250 255

Ser Val Pro Leu Arg Leu Thr Arg Gly Ser Arg Ala Pro Ile Ser Arg
 260 265 270

Ala Gln Leu Ser Val Val Asp Pro Asp Ser Ala Pro Gly Glu Ile Glu
 275 280 285

Tyr Glu Val Gln Arg Ala Pro His Asn Gly Phe Leu Ser Leu Val Gly
 290 295 300

Gly Gly Leu Gly Pro Val Thr Arg Phe Thr Gln Ala Asp Val Asp Ser
 305 310 315 320

Gly Arg Leu Ala Phe Val Ala Asn Gly Ser Ser Val Ala Gly Ile Phe
 325 330 335

Gln Leu Ser Met Ser Asp Gly Ala Ser Pro Pro Leu Pro Met Ser Leu
 340 345 350

Ala Val Asp Ile Leu Pro Ser Ala Ile Glu Val Gln Leu Arg Ala Pro
 355 360 365

Leu Glu Val Pro Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ser Gln Gln Gln
 370 375 380

Leu Arg Val Val Ser Asp Arg Glu Glu Pro Glu Ala Ala Tyr Arg Leu
 385 390 395 400

Ile Gln Gly Pro Gln Tyr Gly His Leu Leu Val Gly Gly Arg Pro Thr
 405 410 415

Ser Ala Phe Ser Gln Phe Gln Ile Asp Gln Gly Glu Val Val Phe Ala
 420 425 430
 Phe Thr Asn Phe Ser Ser Ser His Asp His Phe Arg Val Leu Ala Leu
 435 440 445
 Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Ala Val Val Asn Val Thr Val Arg Ala
 450 455 460
 Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly Ala Thr Leu
 465 470 475 480
 Arg Leu Asp Pro Thr Val Leu Asp Ala Gly Glu Leu Ala Asn Arg Thr
 485 490 495
 Gly Ser Val Pro Arg Phe Arg Leu Leu Glu Gly Pro Arg His Gly Arg
 500 505 510
 Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu Pro Gly Gly Ser Gln Leu
 515 520 525
 Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu Glu Asp Gly Arg Leu Gly Leu
 530 535 540
 Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg Ala Pro Gly Pro Ala Gly Asp Ser
 545 550 555 560
 Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala Gln Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Ser
 565 570 575
 Leu Asp Phe Ala Thr Glu Pro Tyr Asn Ala Ala Arg Pro Tyr Ser Val
 580 585 590
 Ala Leu Leu Ser Val Pro Glu Ala Ala Arg Thr Glu Ala Gly Lys Pro
 595 600 605
 Glu Ser Ser Thr Pro Thr Gly Glu Pro Gly Pro Met Ala Ser Ser Pro
 610 615 620
 Glu Pro Ala Val Ala Lys Gly Gly Phe Leu Ser Phe Leu Glu Ala Asn
 625 630 635 640
 Met Phe Ser

<210> 119
 <211> 428
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> NABA-avi-his

<400> 119

Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
 1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly Tyr Ser
 20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val Gly Tyr
 35 40 45

Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser Gly Arg
 50 55 60

Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln
 65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp Leu Val
 85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
 100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
 115 120 125

Met Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp
 130 135 140

Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
 145 150 155 160

Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn Asp Thr
 165 170 175

Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn Arg Ser
 180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro Thr Ile

22213

195	200	205
Ser 210	Pro 215	Pro 220
Pro 225	Asp 230	Ser 235
Ser 240	Ser 245	Tyr 250
Leu 255	Ser 260	Gly 265
Ala 270	Asn 275	Leu 280
Asn 285	Leu 290	Ser 295
Ser 300	Leu 305	Asn 310
Asn 315	Tyr 320	Trp 325
Arg 330	Ile 335	Asn 340
Asn 345	Leu 350	Ser 355
Ser 360	Ala 365	Gln 370
Lys 375	Ile 380	Val 385
Glu 390	Ser 395	Pro 400
Thr 405	Val 410	Asn 415
Thr 420	Val 425	Asn 430
Thr 435	Val 440	Asn 445
Thr 450	Val 455	Asn 460
Thr 465	Val 470	Asn 475
Thr 480	Val 485	Asn 490
Thr 495	Val 500	Asn 505
Thr 510	Val 515	Asn 520
Thr 525	Val 530	Asn 535
Thr 540	Val 545	Asn 550
Thr 555	Val 560	Asn 565
Thr 570	Val 575	Asn 580
Thr 585	Val 590	Asn 595
Thr 600	Val 605	Asn 610
Thr 615	Val 620	Asn 625
Thr 630	Val 635	Asn 640
Thr 645	Val 650	Asn 655
Thr 660	Val 665	Asn 670
Thr 675	Val 680	Asn 685
Thr 690	Val 695	Asn 700
Thr 705	Val 710	Asn 715
Thr 720	Val 725	Asn 730
Thr 735	Val 740	Asn 745
Thr 750	Val 755	Asn 760
Thr 765	Val 770	Asn 775
Thr 780	Val 785	Asn 790
Thr 795	Val 800	Asn 805
Thr 810	Val 815	Asn 820
Thr 825	Val 830	Asn 835
Thr 840	Val 845	Asn 850
Thr 855	Val 860	Asn 865
Thr 870	Val 875	Asn 880
Thr 885	Val 890	Asn 895
Thr 900	Val 905	Asn 910
Thr 915	Val 920	Asn 925
Thr 930	Val 935	Asn 940
Thr 945	Val 950	Asn 955
Thr 960	Val 965	Asn 970
Thr 975	Val 980	Asn 985
Thr 990	Val 995	Asn 1000

<210> 120

22213

<211> 360
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD3e stalk-Fc(phần phình)-Avi

<400> 120

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys
 1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro
 20 25 30

Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp
 35 40 45

Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys
 50 55 60

Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg
 65 70 75 80

Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg
 85 90 95

Val Ser Glu Asn Cys Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser
 100 105 110

Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 115 120 125

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 130 135 140

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 145 150 155 160

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 165 170 175

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 180 185 190

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 195 200 205

22213

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
210 215 220

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
225 230 235 240

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys
245 250 255

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
260 265 270

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
275 280 285

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
290 295 300

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
305 310 315 320

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
325 330 335

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu
340 345 350

Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
355 360

<210> 121

<211> 325

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD3d stalk-Fc(phần lõm)

<400> 121

Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe Val Asn Cys
1 5 10 15

Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val Gly Thr Leu Leu Ser
20 25 30

Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly

22213

35

40

45

Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys Asp Lys Glu Ser Thr
50 55 60

Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Arg Ser Glu Gln Leu Tyr Phe Gln
65 70 75 80

Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
85 90 95

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
100 105 110

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
115 120 125

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
130 135 140

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
145 150 155 160

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
165 170 175

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
180 185 190

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
195 200 205

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
210 215 220

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
225 230 235 240

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
245 250 255

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
260 265 270

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

22213

275

280

285

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 290 295 300

Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys
 305 310 315 320

Ile Glu Trp His Glu
 325

<210> 122
 <211> 658
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 122

Leu Ser Leu Glu Gly Thr Arg Lys Leu Thr Val Cys Pro Glu Ser Val
 1 5 10 15

Gln Pro Leu Ser Ser Gln Ser Leu Ser Ala Ser Ser Ser Thr Gly Ala
 20 25 30

Asp Pro Arg His Leu Leu Tyr Arg Val Val Arg Gly Pro Gln Leu Gly
 35 40 45

Arg Leu Leu His Ala Gln Gln Gly Ser Ala Glu Glu Val Leu Val Asn
 50 55 60

Phe Thr Gln Ala Glu Val Asn Ala Gly Asn Ile Leu Tyr Glu His Glu
 65 70 75 80

Met Ser Ser Glu Pro Phe Trp Glu Ala His Asp Thr Ile Gly Leu Leu
 85 90 95

Leu Ser Ser Pro Pro Ala Arg Asp Leu Ala Ala Thr Leu Ala Val Met
 100 105 110

Val Ser Phe Asp Ala Ala Cys Pro Gln Arg Pro Ser Arg Leu Trp Lys
 115 120 125

Asn Lys Gly Leu Trp Val Pro Glu Gly Gln Arg Ala Lys Ile Thr Val
 130 135 140

Ala Ala Leu Asp Ala Ala Asn Leu Leu Ala Ser Val Pro Ala Ser Gln
 145 150 155 160

Arg Ser Arg His Asp Val Leu Phe Gln Val Thr Gln Phe Pro Thr Arg
 165 170 175

Gly Gln Leu Leu Val Ser Glu Glu Pro Leu His Ala Arg Arg Pro Tyr
 180 185 190

Phe Leu Gln Ser Glu Leu Ala Ala Gly Gln Leu Val Tyr Ala His Gly
 195 200 205

Gly Gly Gly Thr Gln Gln Asp Gly Phe Arg Phe Arg Ala His Leu Gln
 210 215 220

Gly Pro Thr Gly Thr Ser Val Ala Gly Pro Gln Thr Ser Glu Ala Phe
 225 230 235 240

Val Ile Thr Val Arg Asp Val Asn Glu Arg Pro Pro Gln Pro Gln Ala
 245 250 255

Ser Ile Pro Leu Arg Val Thr Arg Gly Ser Arg Ala Pro Val Ser Arg
 260 265 270

Ala Gln Leu Ser Val Val Asp Pro Asp Ser Ala Pro Gly Glu Ile Glu
 275 280 285

Tyr Glu Val Gln Arg Ala Pro His Asn Gly Phe Leu Ser Leu Ala Gly
 290 295 300

Asp Asn Thr Gly Pro Val Thr His Phe Thr Gln Ala Asp Val Asp Ala
 305 310 315 320

Gly Arg Leu Ala Phe Val Ala Asn Gly Ser Ser Val Ala Gly Val Phe
 325 330 335

Gln Leu Ser Met Ser Asp Gly Ala Ser Pro Pro Ile Pro Met Ser Leu
 340 345 350

Ala Val Asp Val Leu Pro Ser Thr Ile Glu Val Gln Leu Arg Ala Pro
 355 360 365

Leu Glu Val Pro Gln Ala Leu Gly Arg Thr Ser Leu Ser Arg Gln Gln
 370 375 380

Leu Gln Val Ile Ser Asp Arg Glu Glu Pro Asp Val Ala Tyr Arg Leu
 385 390 395 400

Thr Gln Gly Pro Leu Tyr Gly Gln Leu Leu Val Gly Gly Gln Pro Ala
 405 410 415

Ser Ala Phe Ser Gln Leu Gln Val Asp Gln Gly Asp Val Val Phe Val
 420 425 430

Phe Thr Asn Phe Ser Ser Ser Gln Asp His Phe Lys Val Val Ala Leu
 435 440 445

Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Ala Thr Val Asn Val Thr Val Gln Ala
 450 455 460

Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly Thr Thr Leu
 465 470 475 480

Arg Leu Asp Pro Thr Val Leu Asp Ala Ser Glu Leu Ala Asn Arg Thr
 485 490 495

Gly Ser Met Pro His Phe Arg Leu Leu Ala Gly Pro Arg Tyr Gly Arg
 500 505 510

Val Val Arg Val Ser Gln Gly Arg Thr Glu Ser Arg Ser Asn Gln Leu
 515 520 525

Val Glu His Phe Thr Gln Arg Asp Leu Glu Glu Gly Gln Leu Gly Leu
 530 535 540

Glu Val Gly Lys Pro Glu Gly Arg Ser Thr Gly Pro Ala Gly Asp Arg
 545 550 555 560

Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala Lys Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Leu
 565 570 575

Leu Asp Phe Ala Thr Glu Pro Tyr His Ala Ala Lys Ser Tyr Ser Val
 580 585 590

Ala Leu Leu Ser Val Pro Glu Ala Val Arg Thr Glu Thr Glu Lys Pro
 595 600 605

Gly Arg Ser Val Pro Thr Gly Gln Pro Gly Gln Ala Ala Ser Ser Pro
 610 615 620

Val Pro Thr Ala Ala Lys Gly Gly Val Asp Gly Leu Asn Asp Ile Phe
 625 630 635 640

22213

Glu	Ala	Gln	Lys	Ile	Glu	Trp	His	Glu	Ala	Arg	Ala	His	His	His	His
				645					650					655	

His His

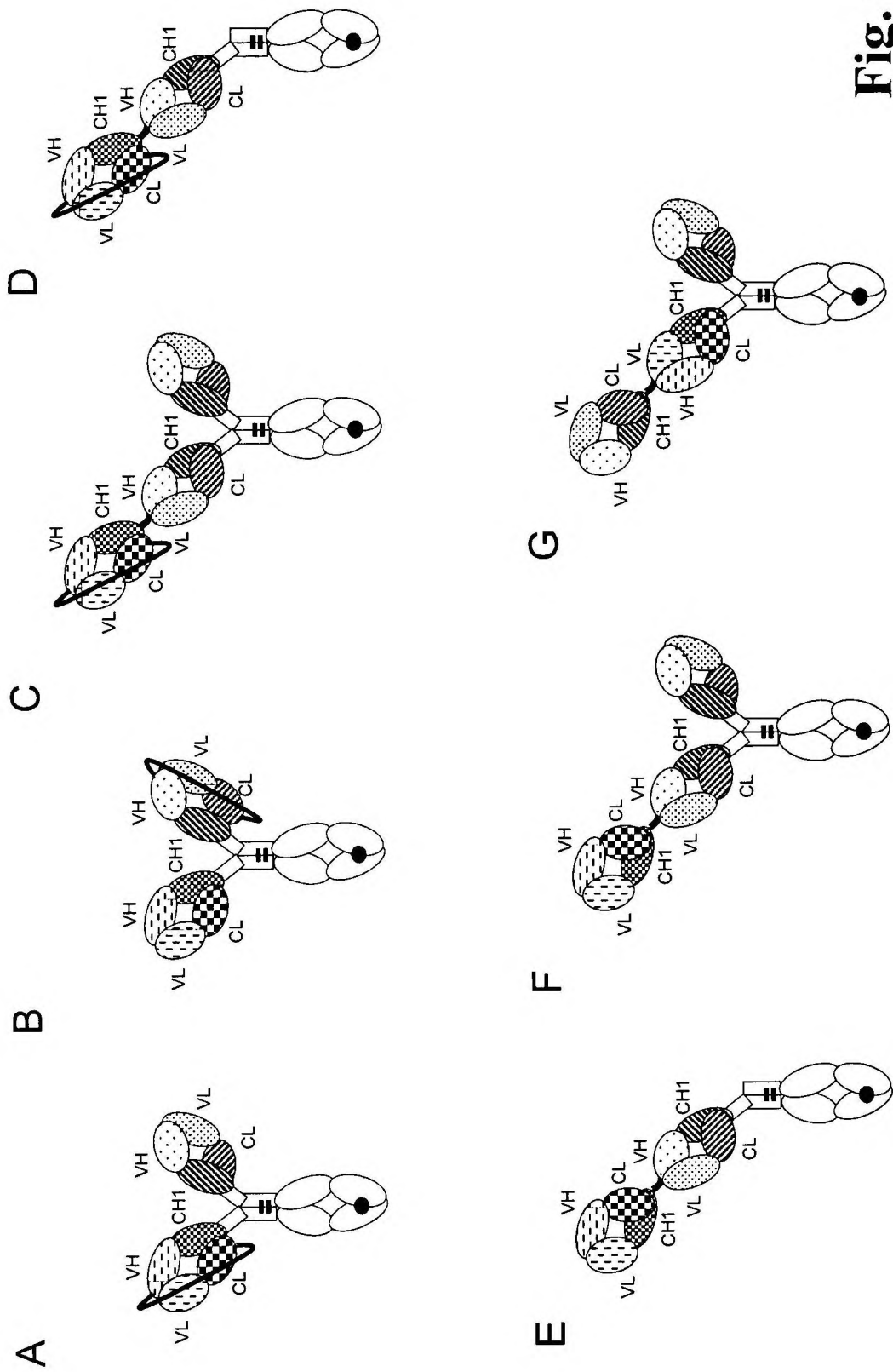
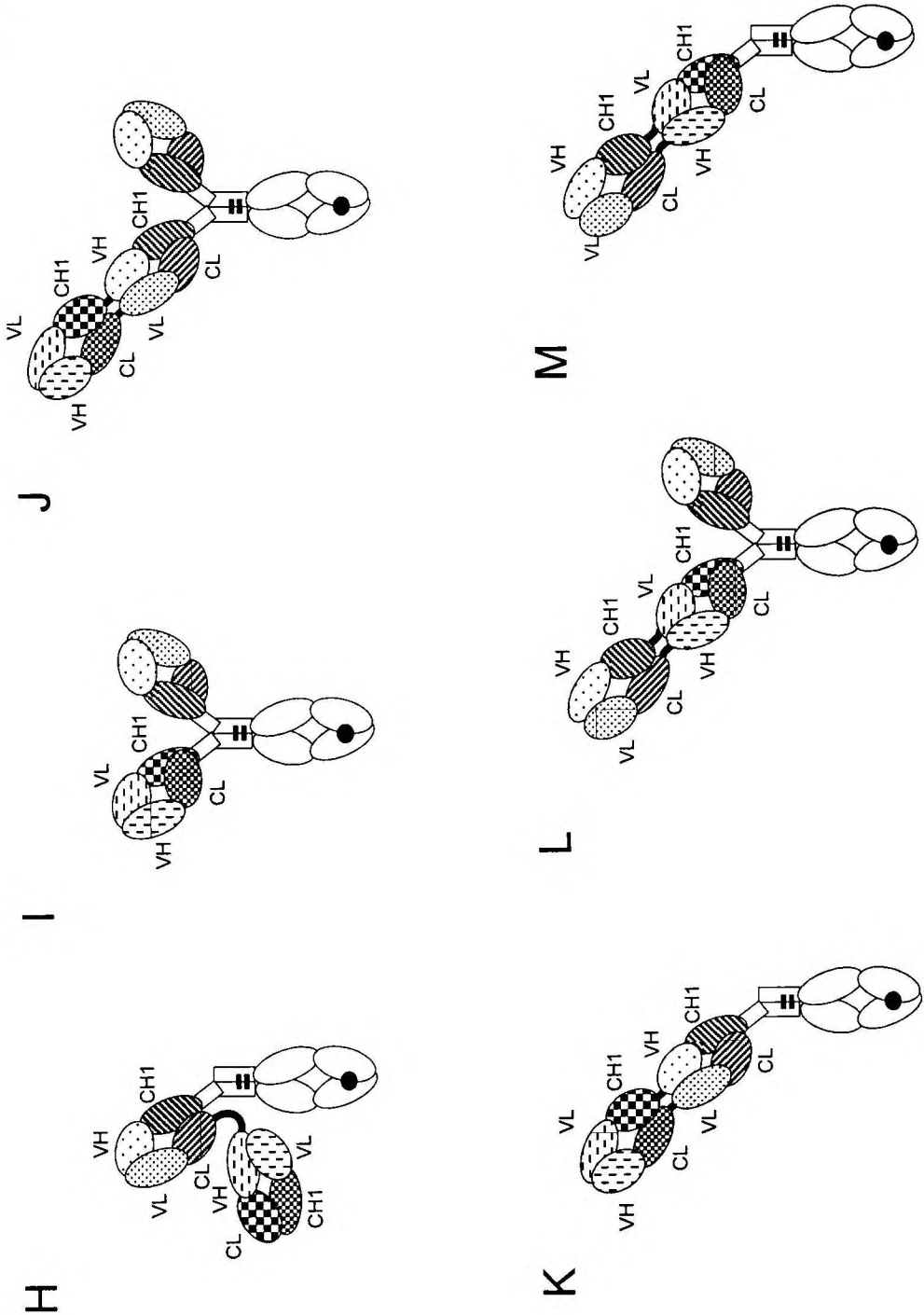
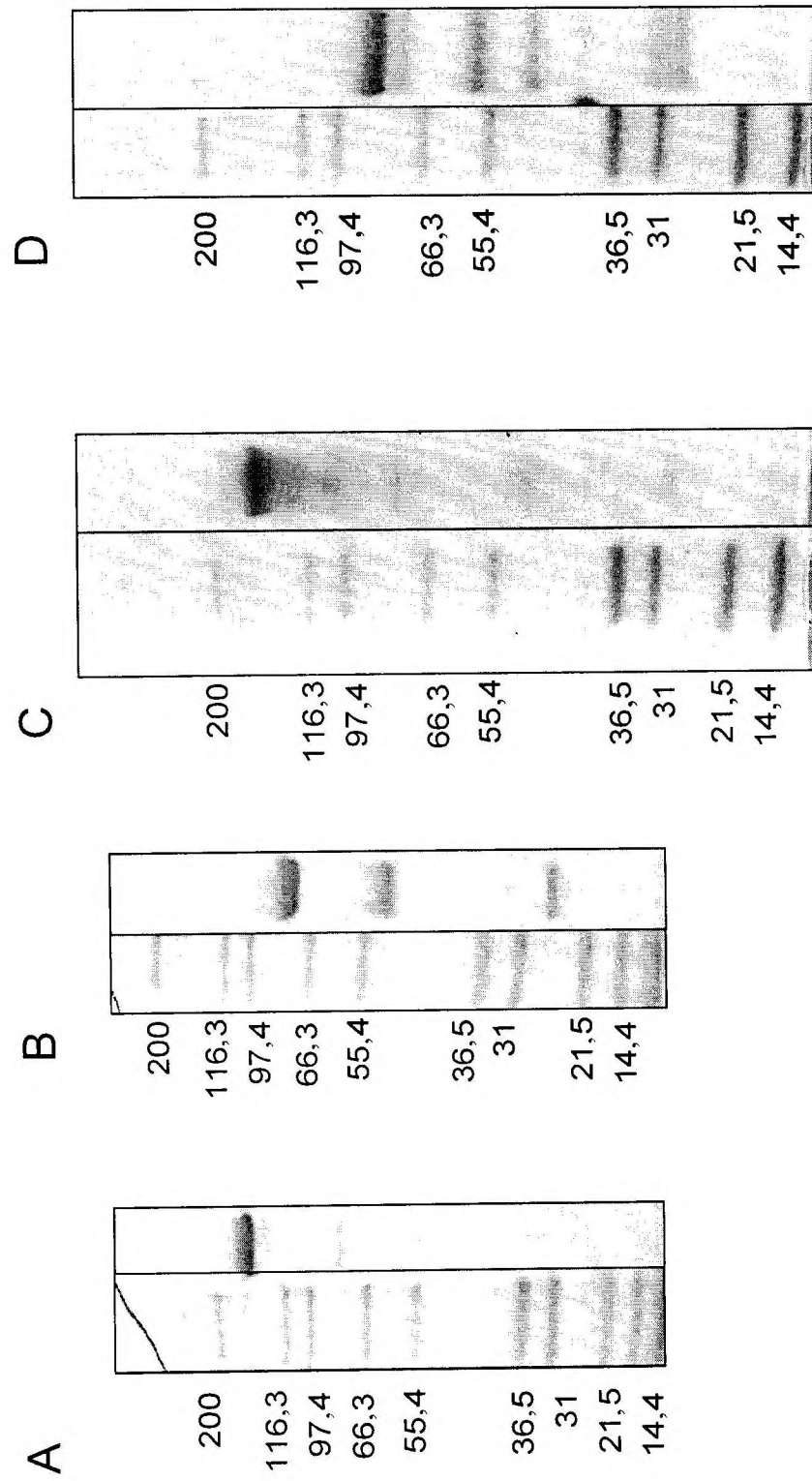
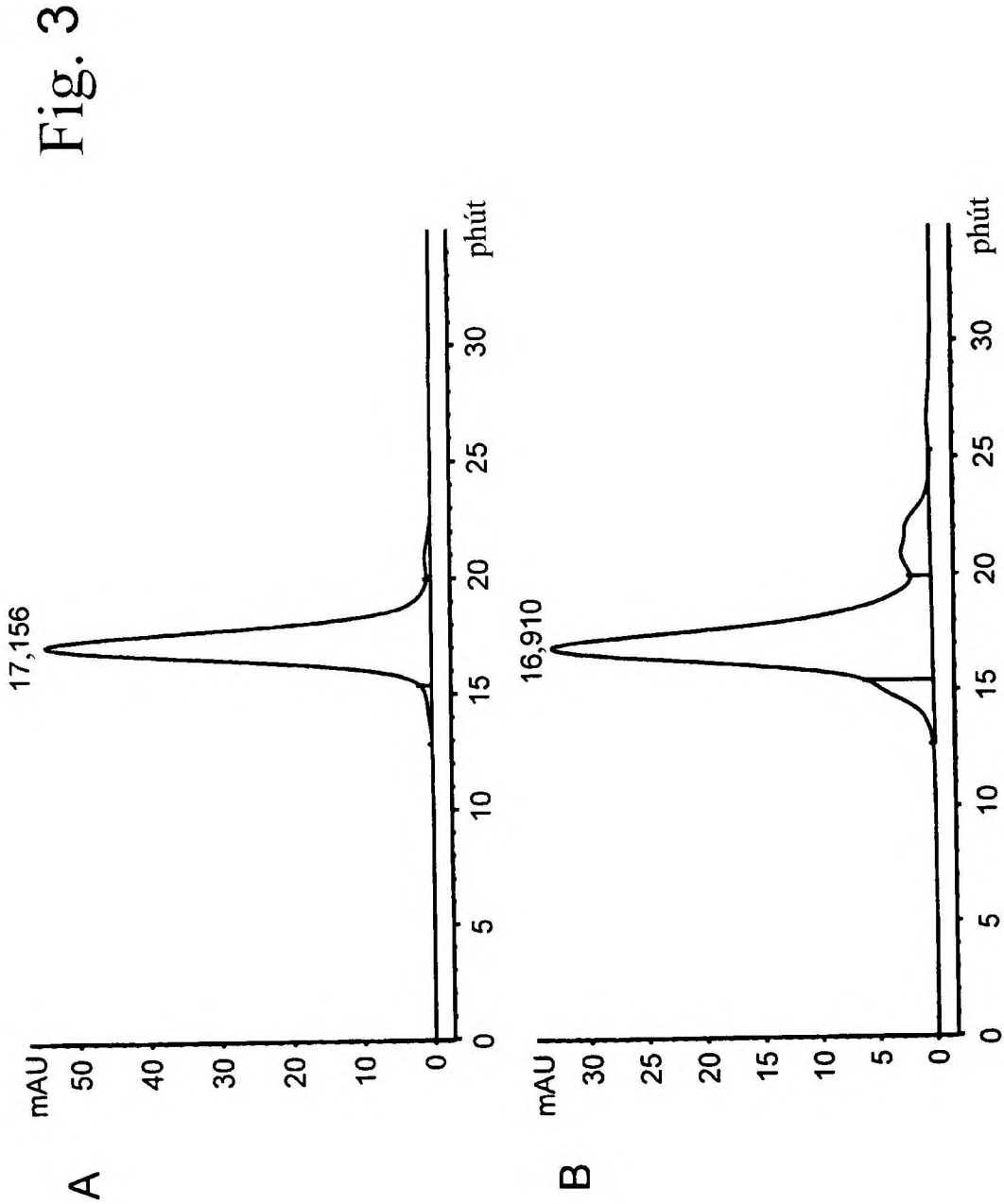


Fig. 1

Fig. 1



**Fig. 2**



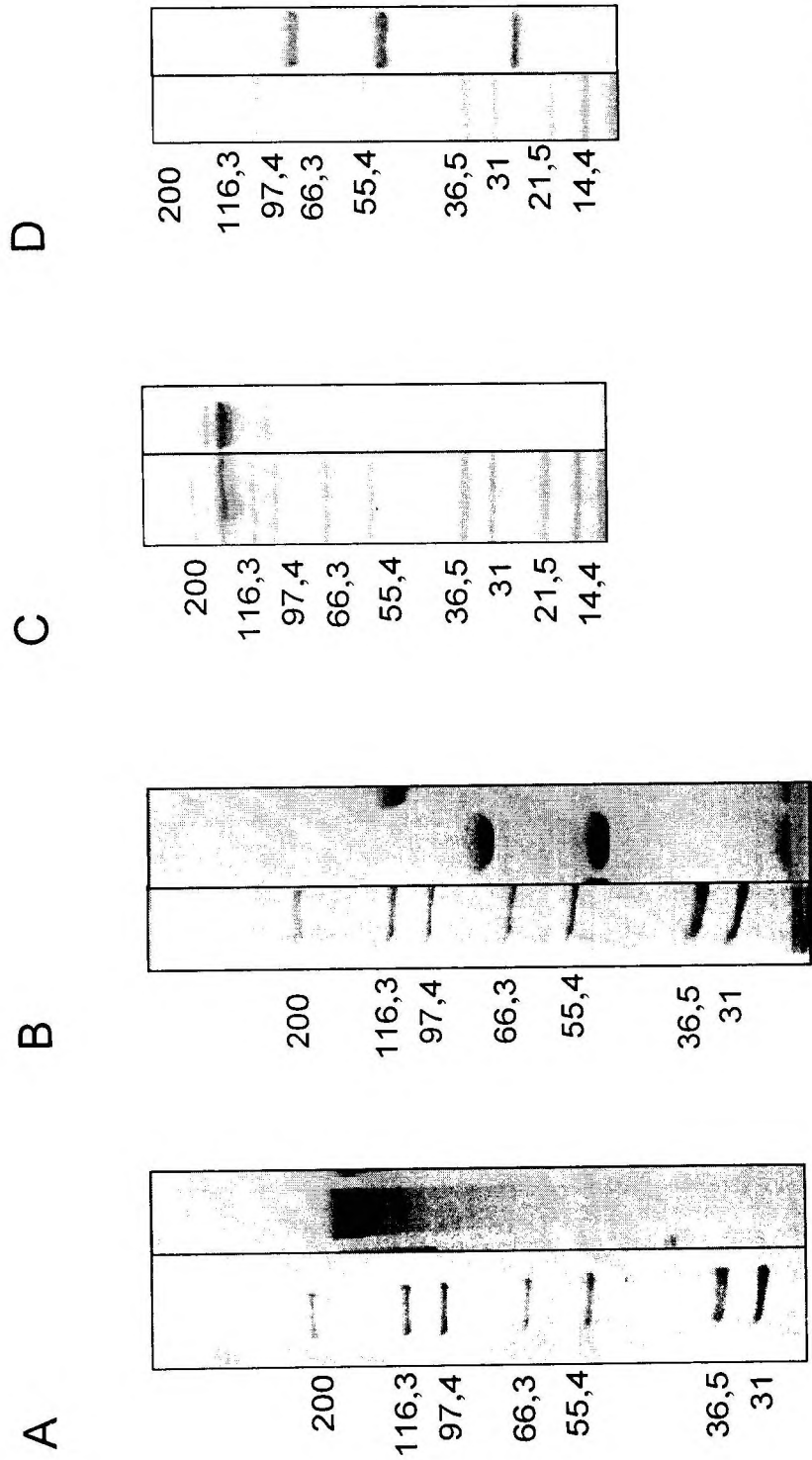


Fig. 4

Fig. 5

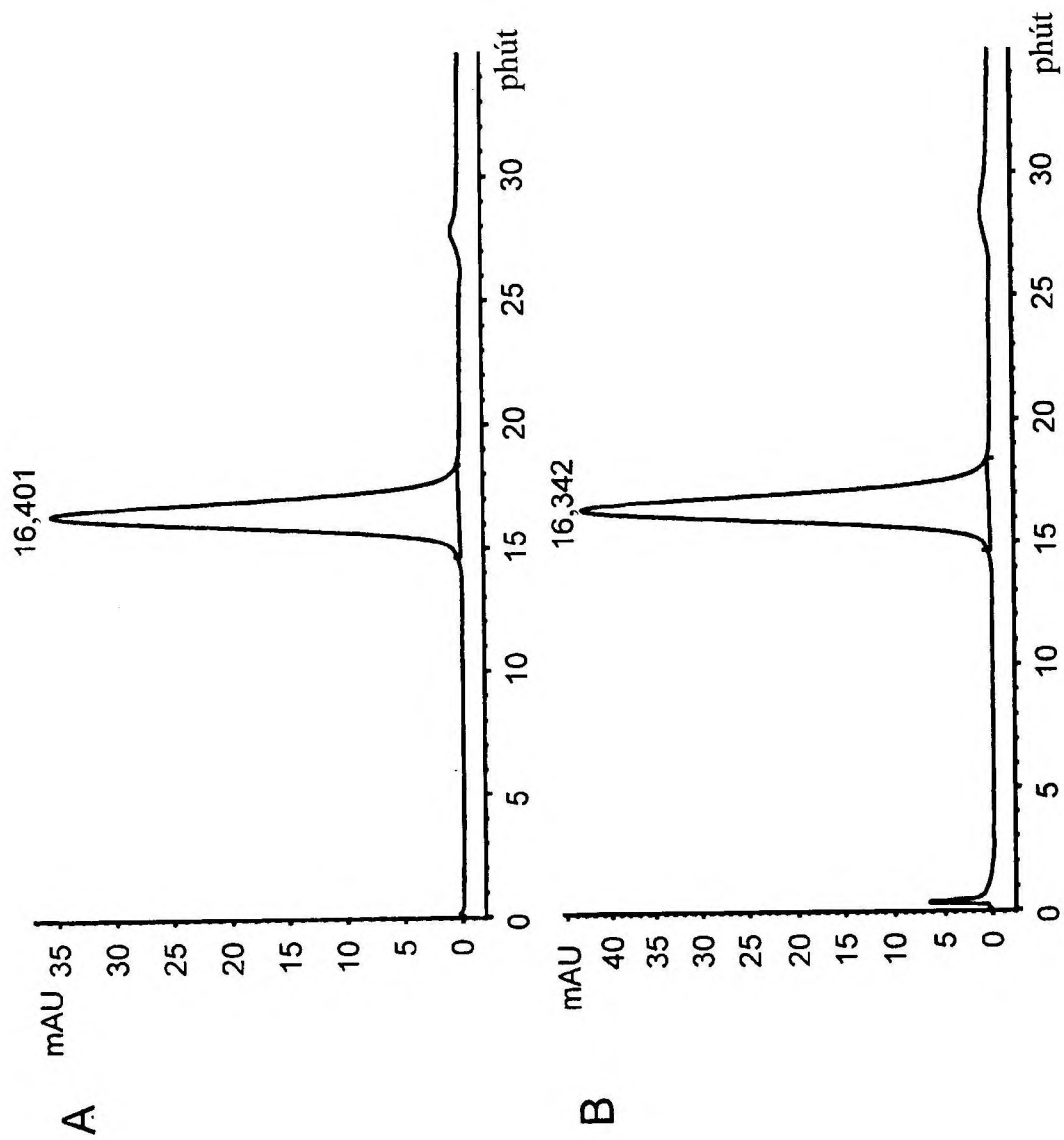
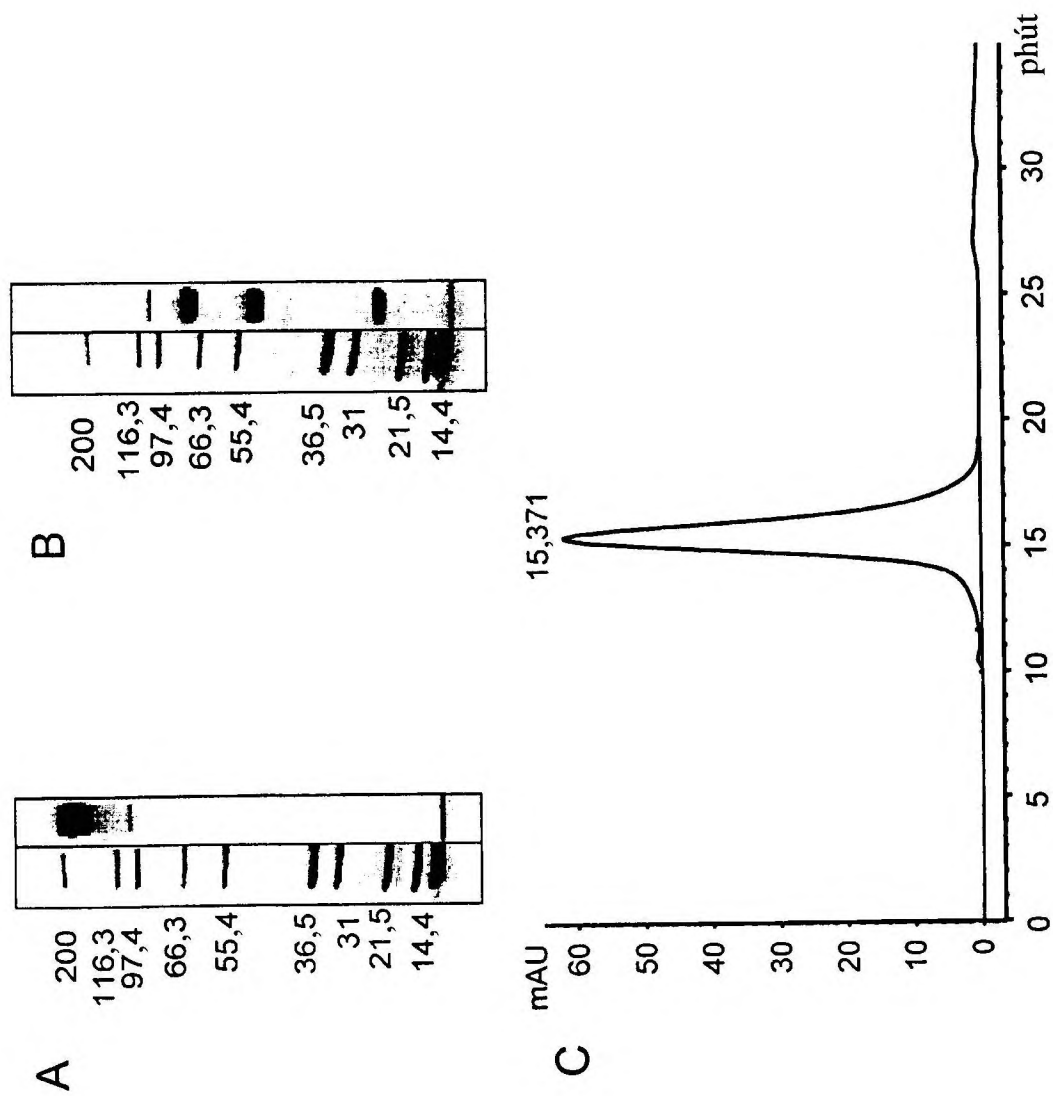


Fig. 6



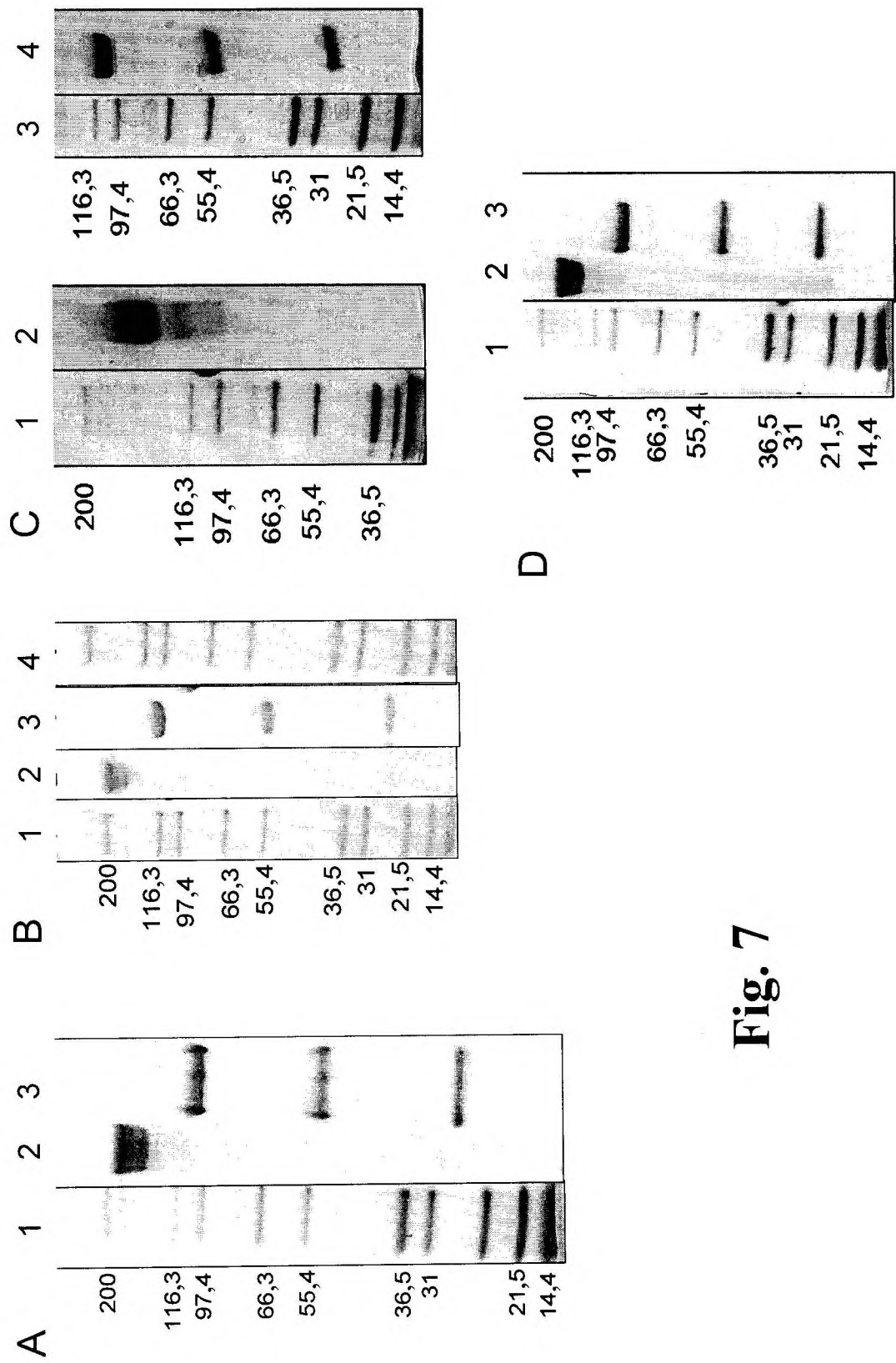


Fig. 7

Fig. 8

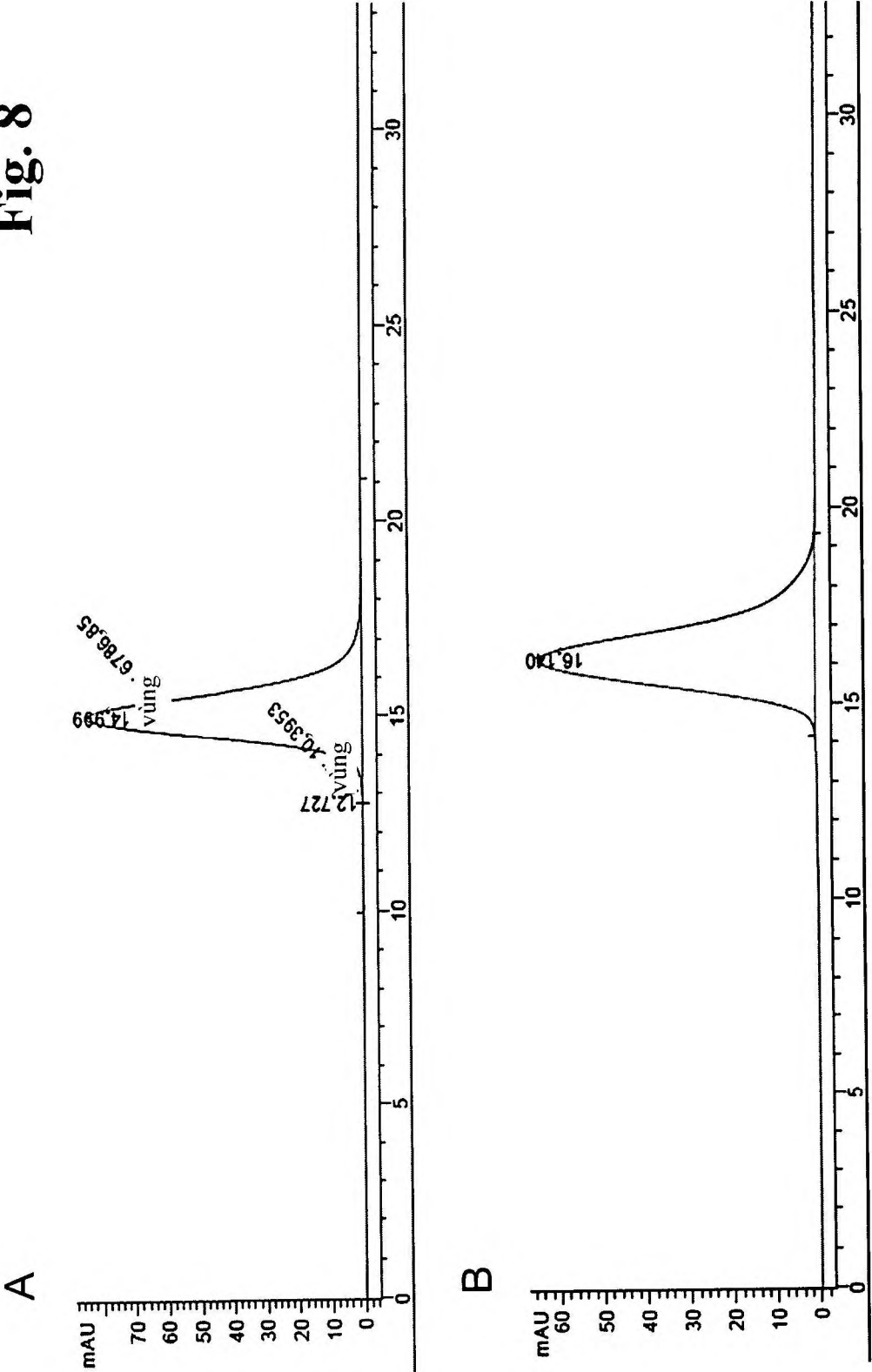
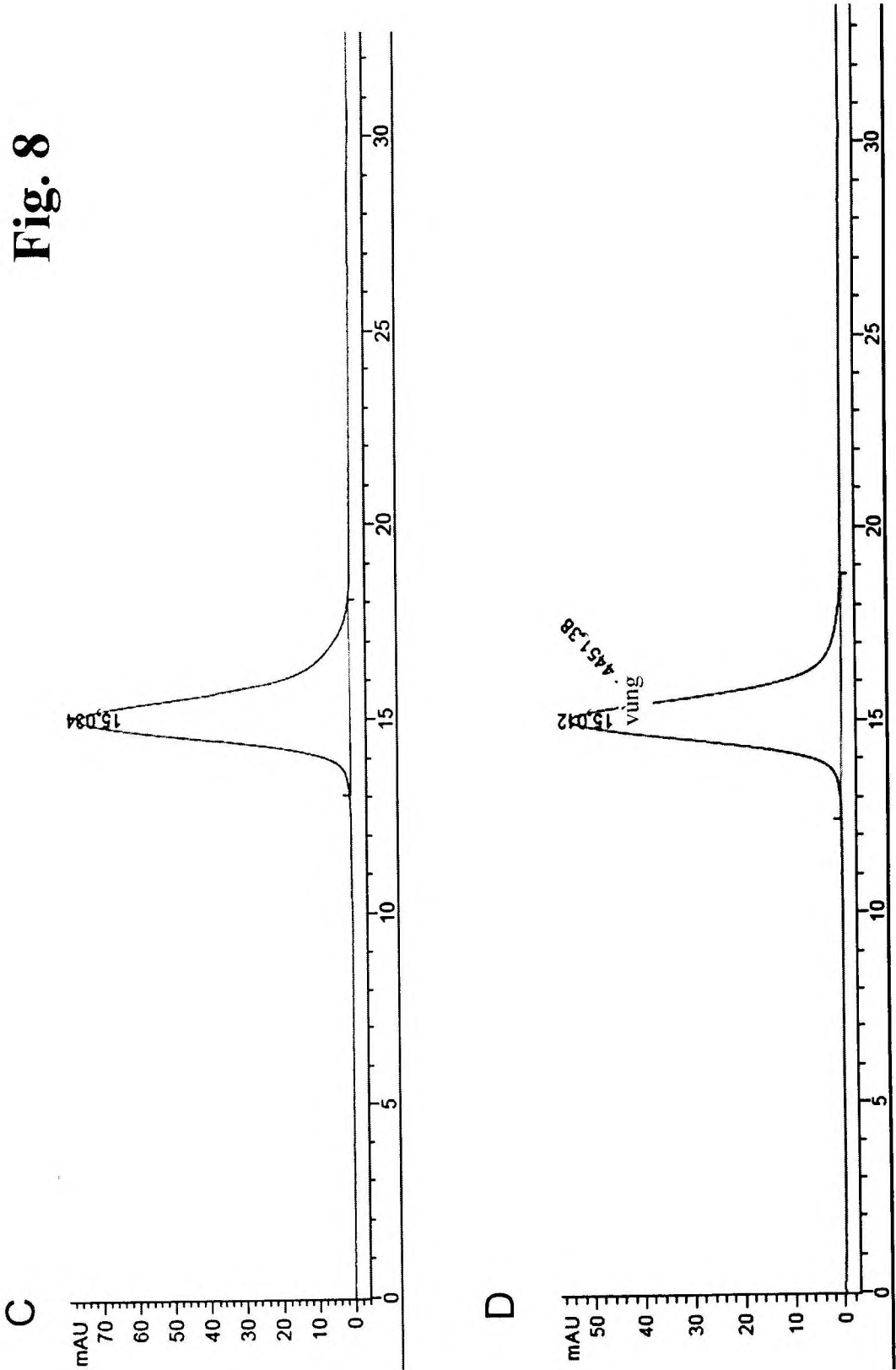


Fig. 8



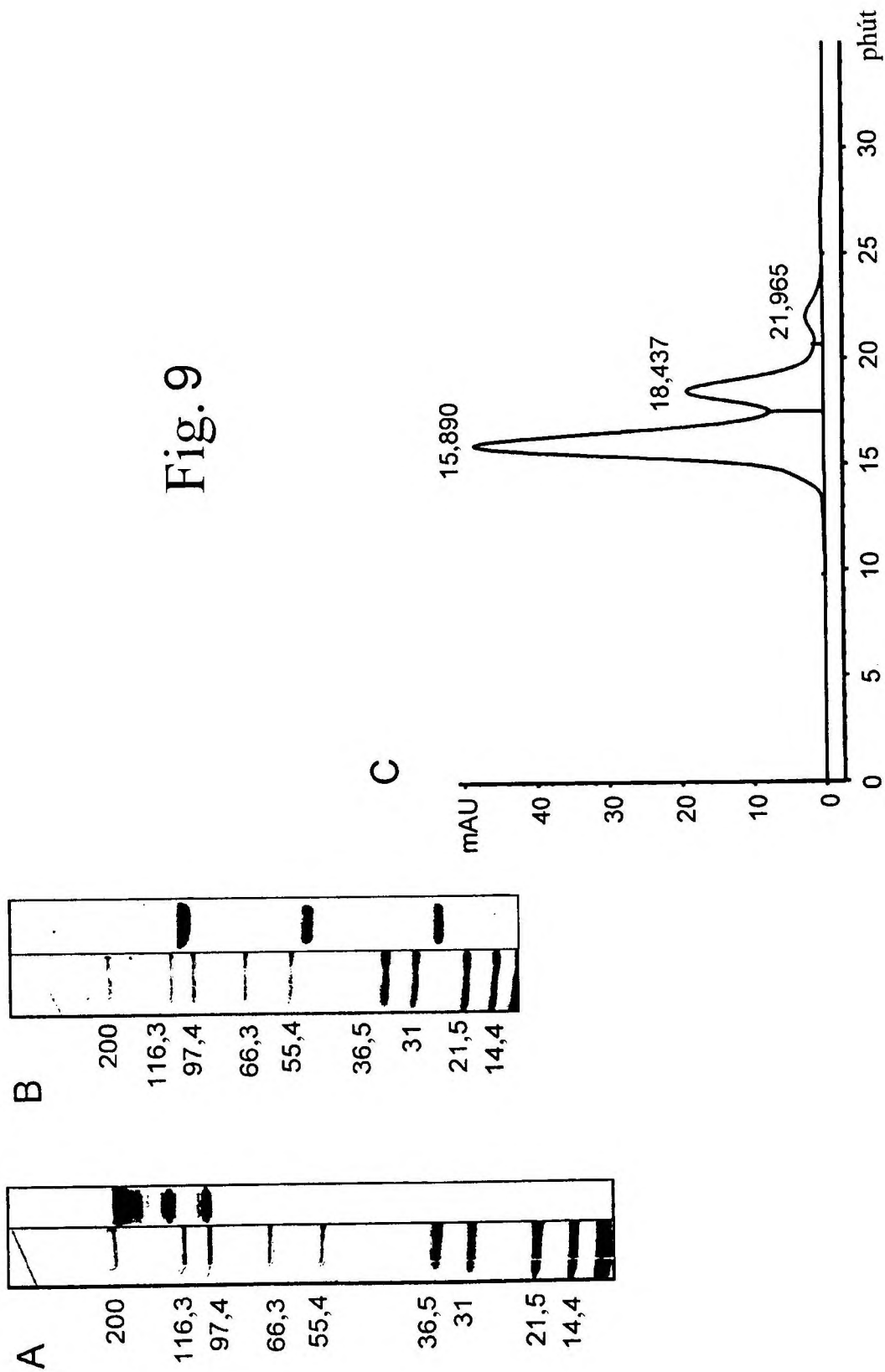


Fig. 9

Fig.10

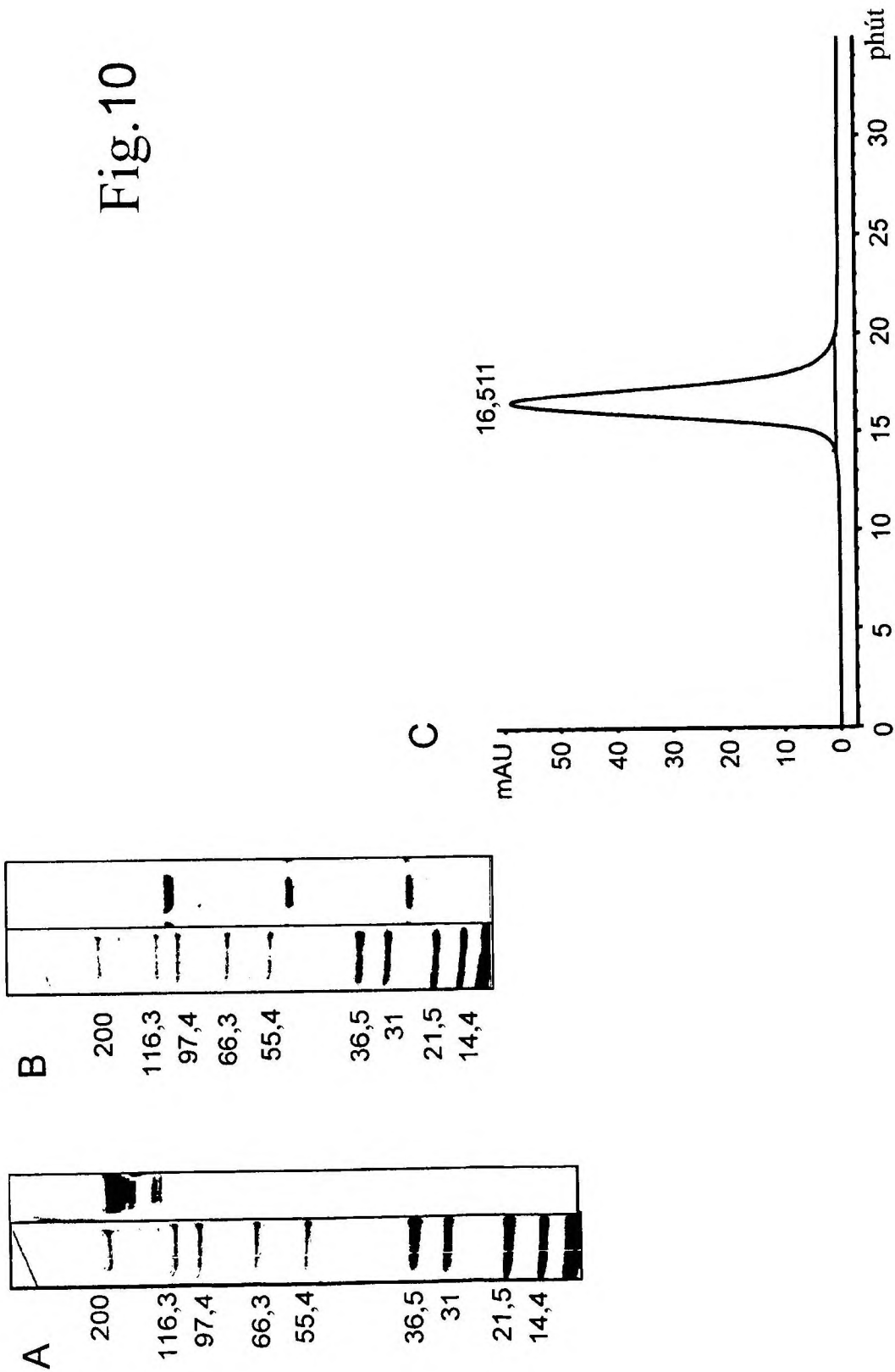
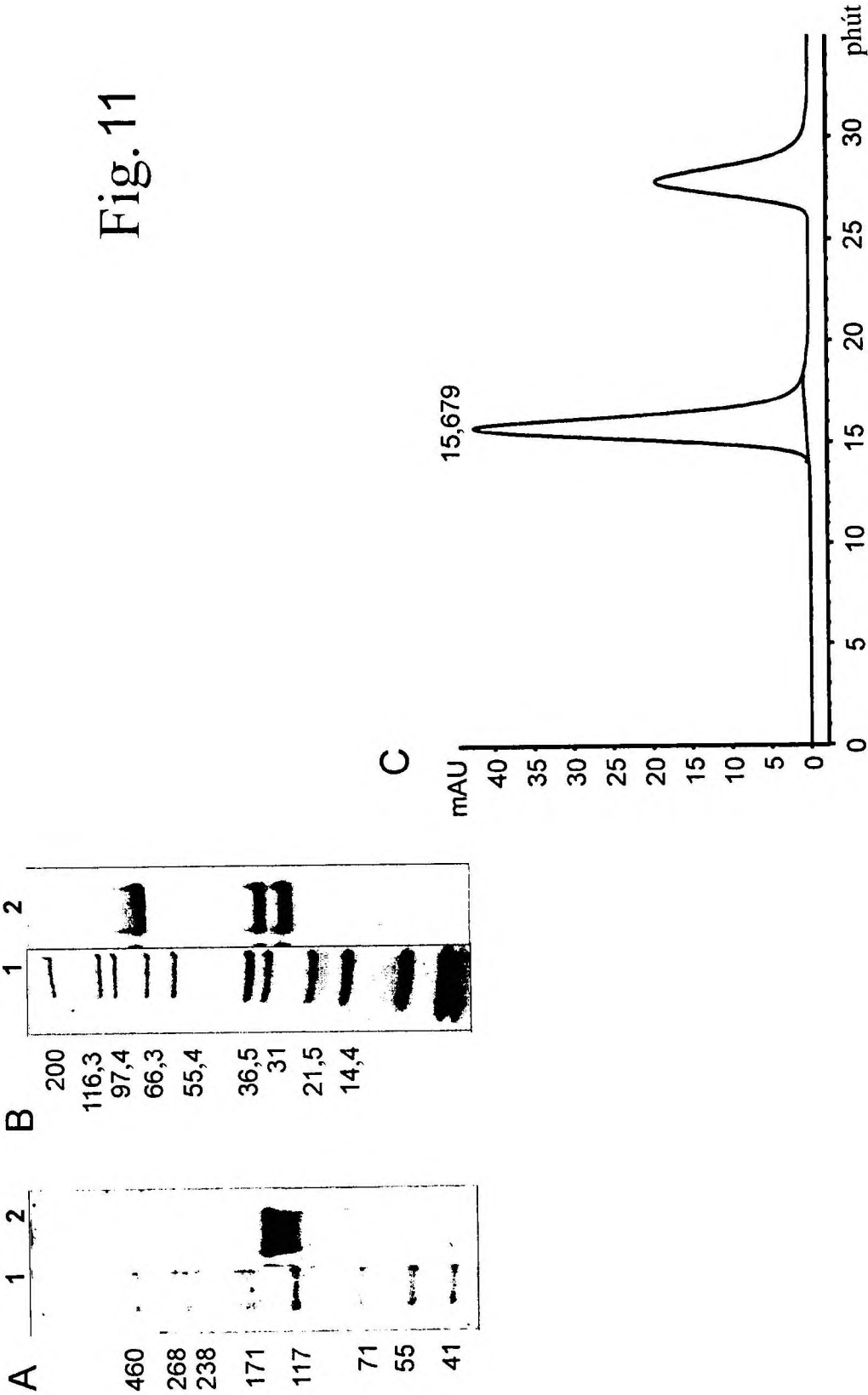


Fig.11



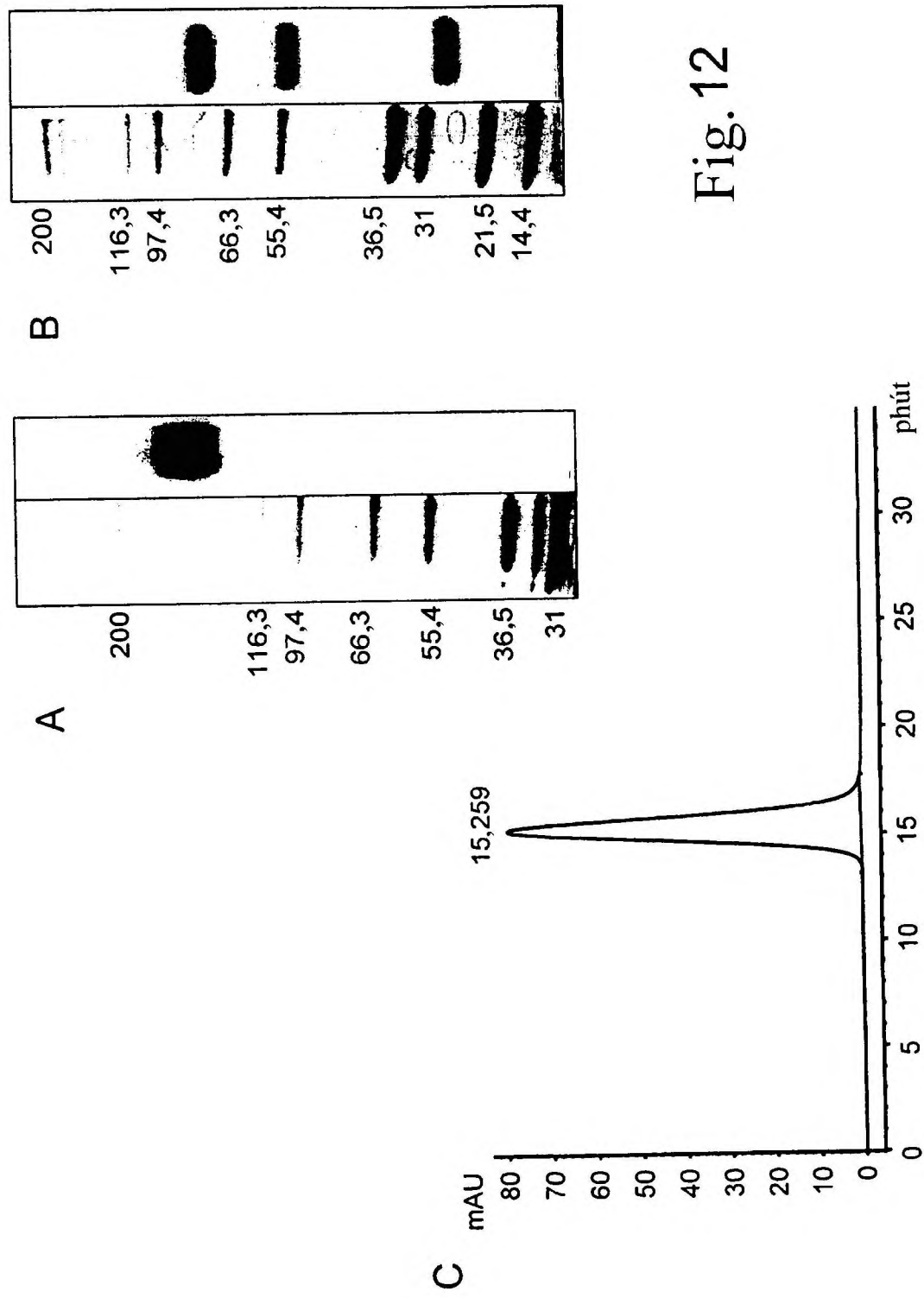
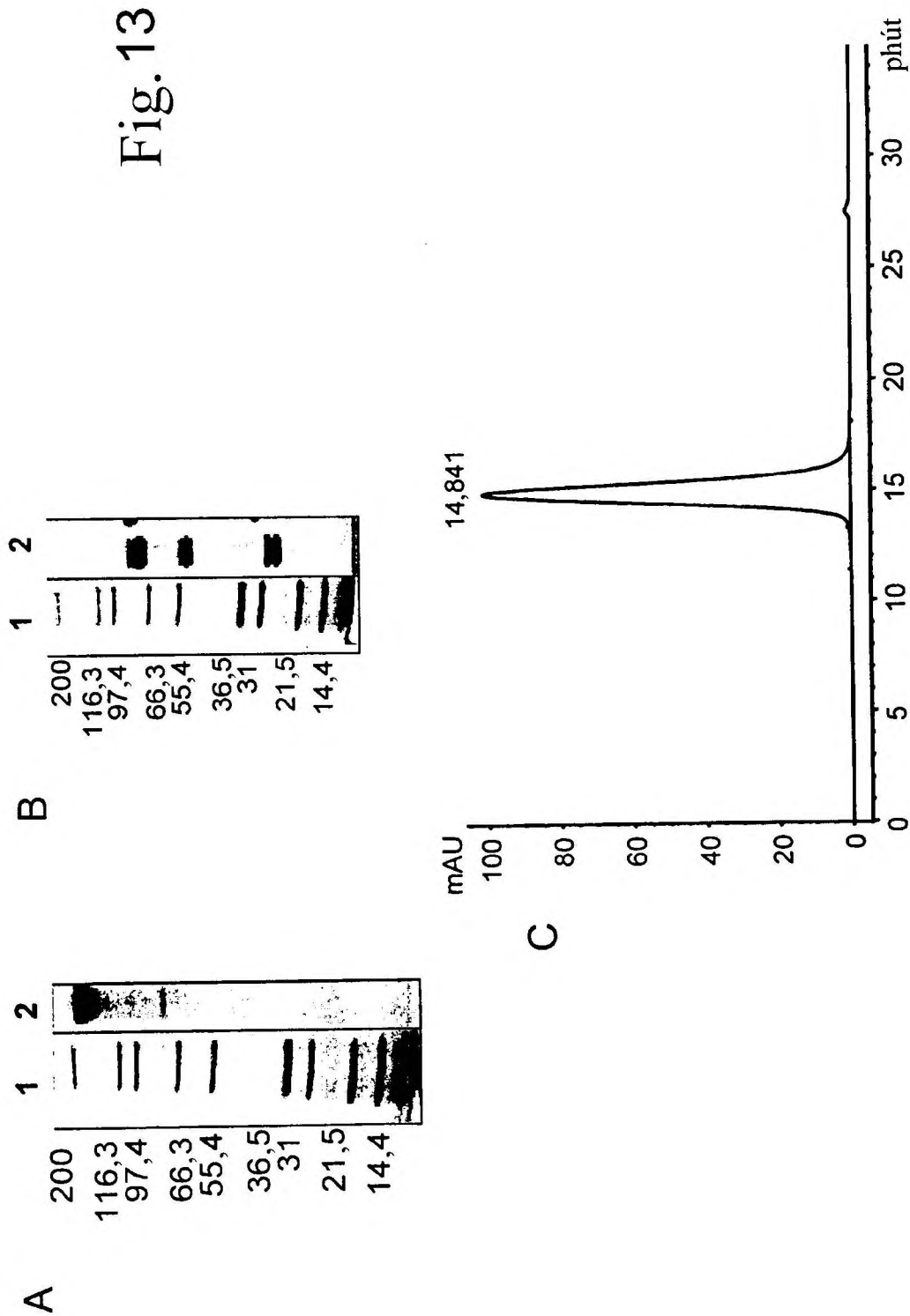


Fig. 12



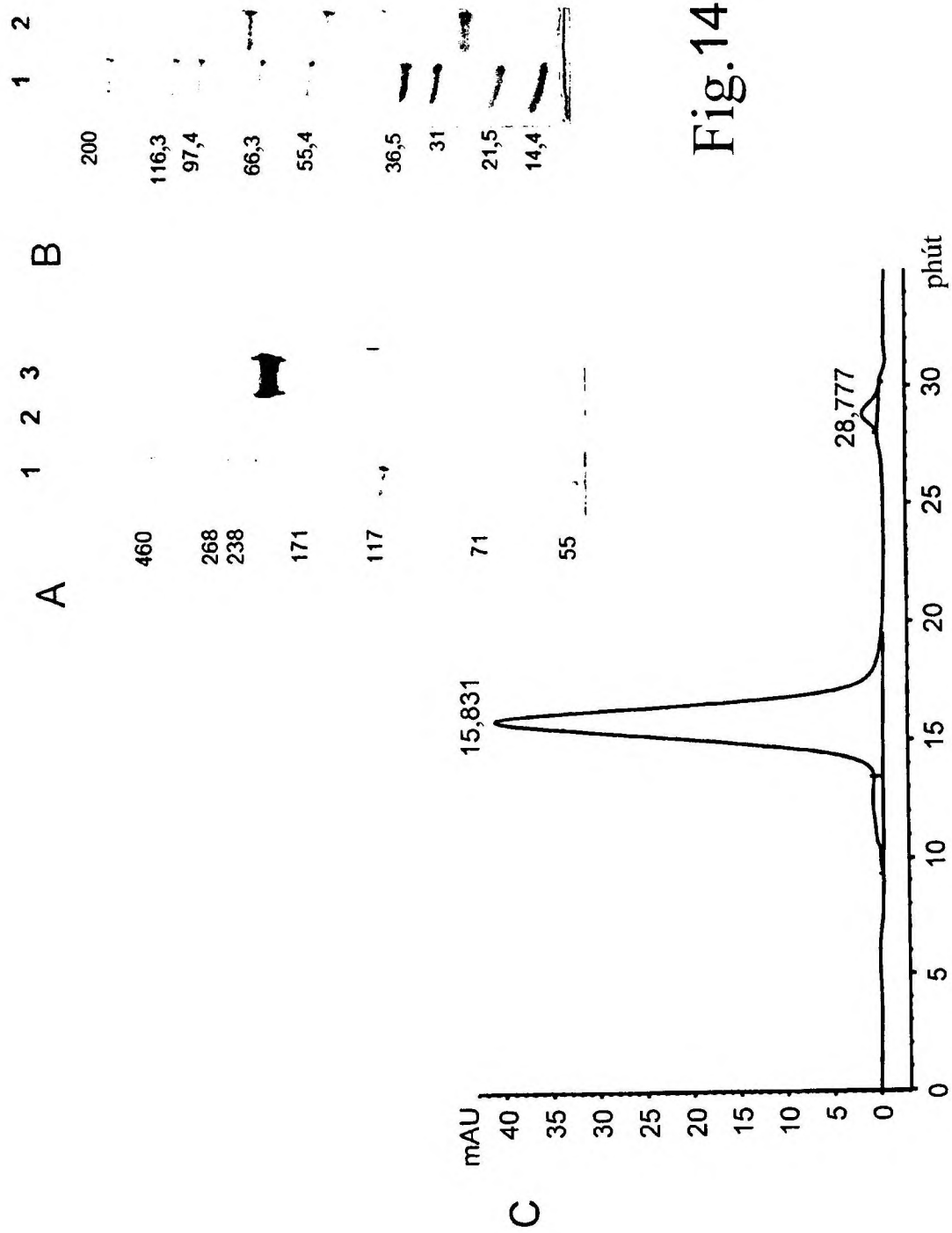
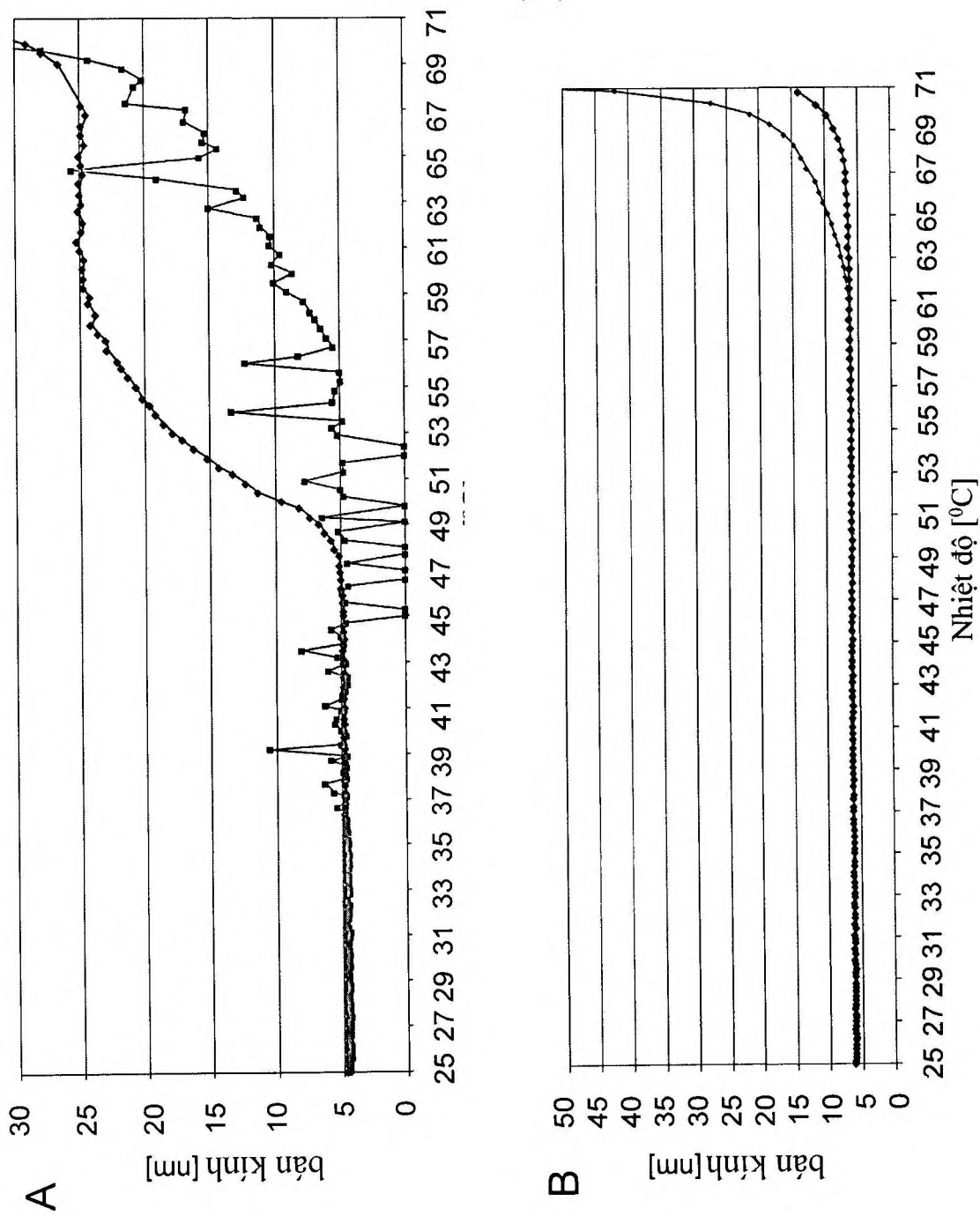


Fig.14



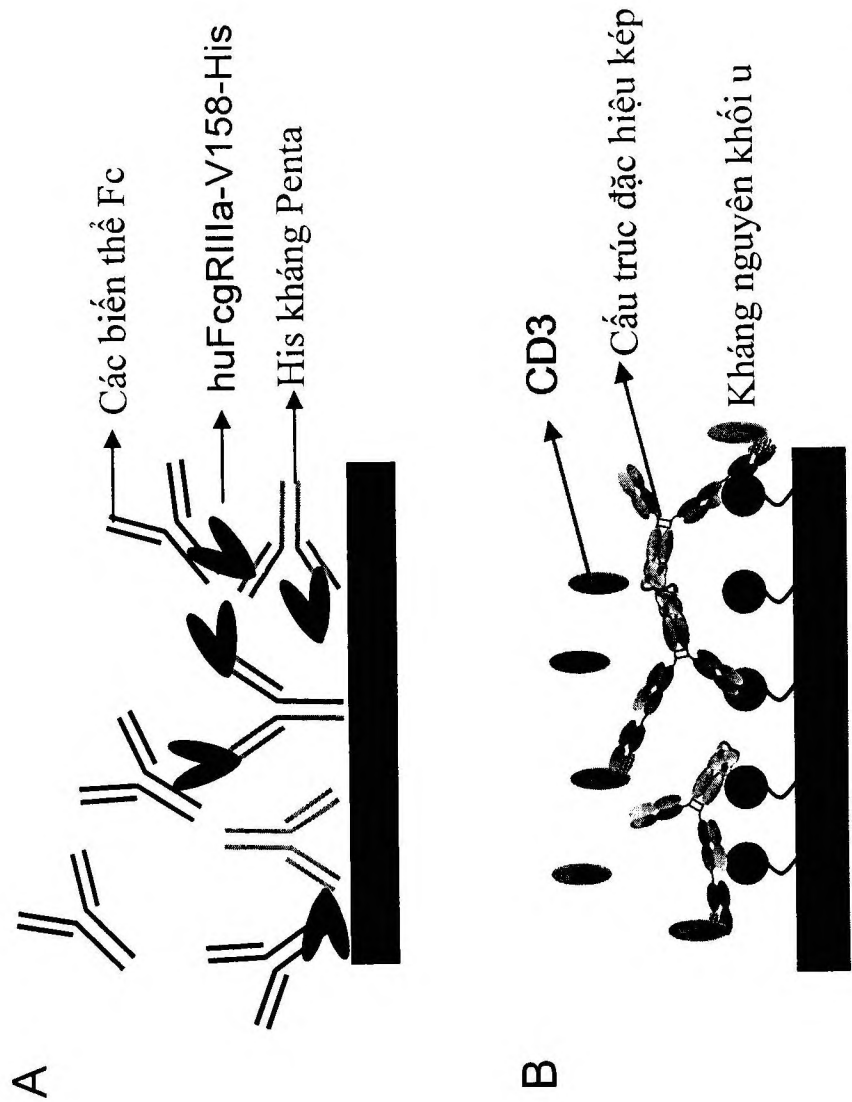


Fig. 16

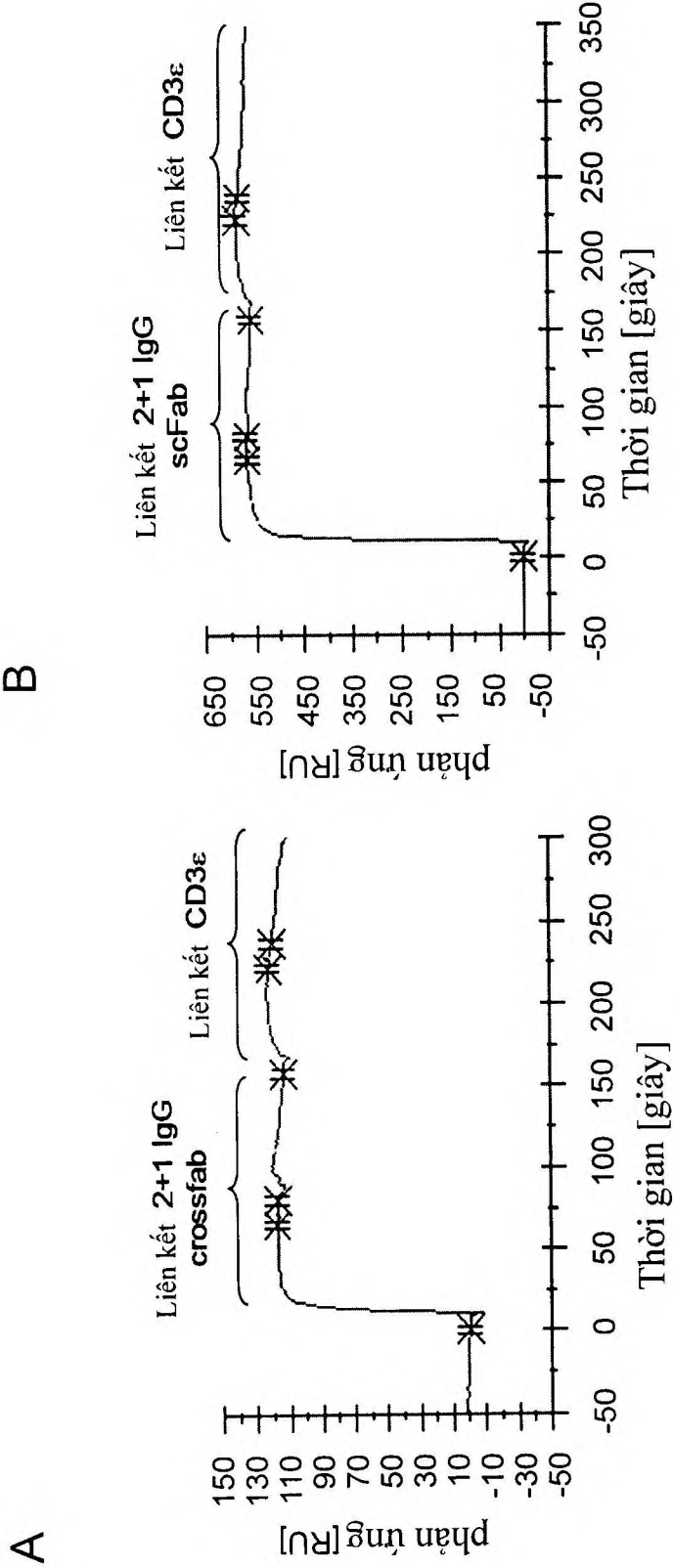


Fig. 17

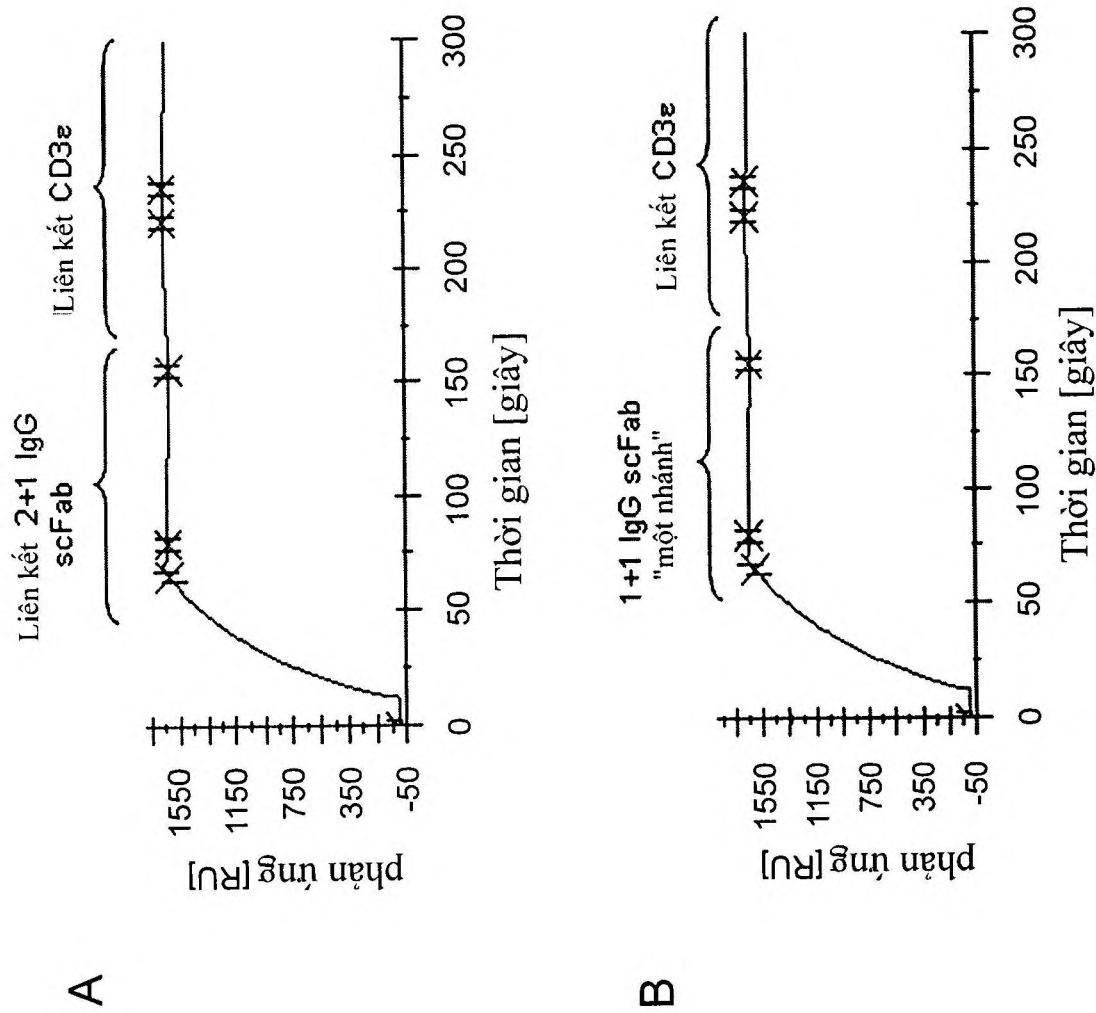


Fig. 18

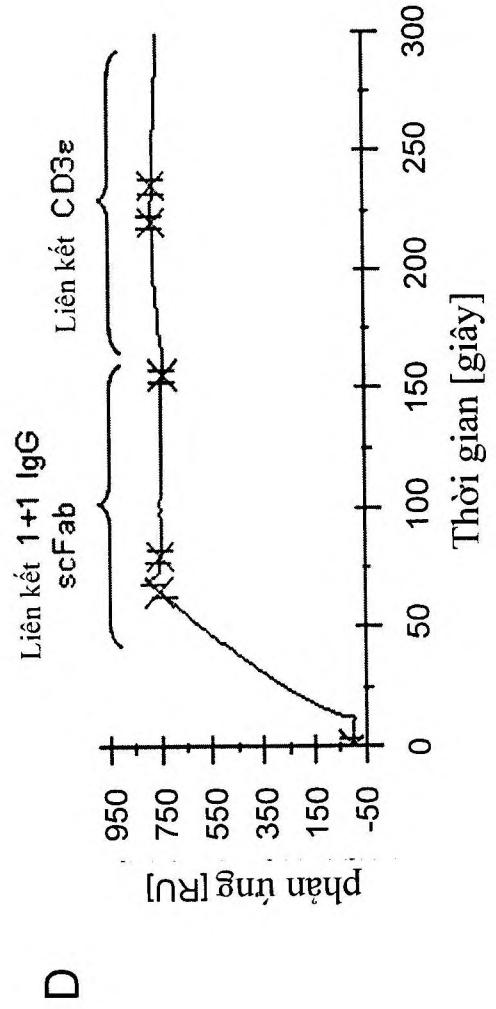
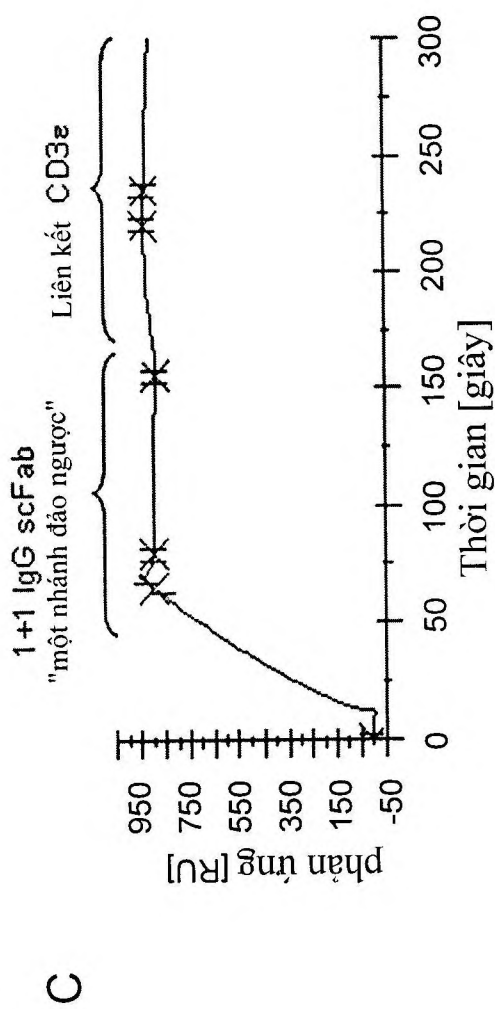


Fig. 18

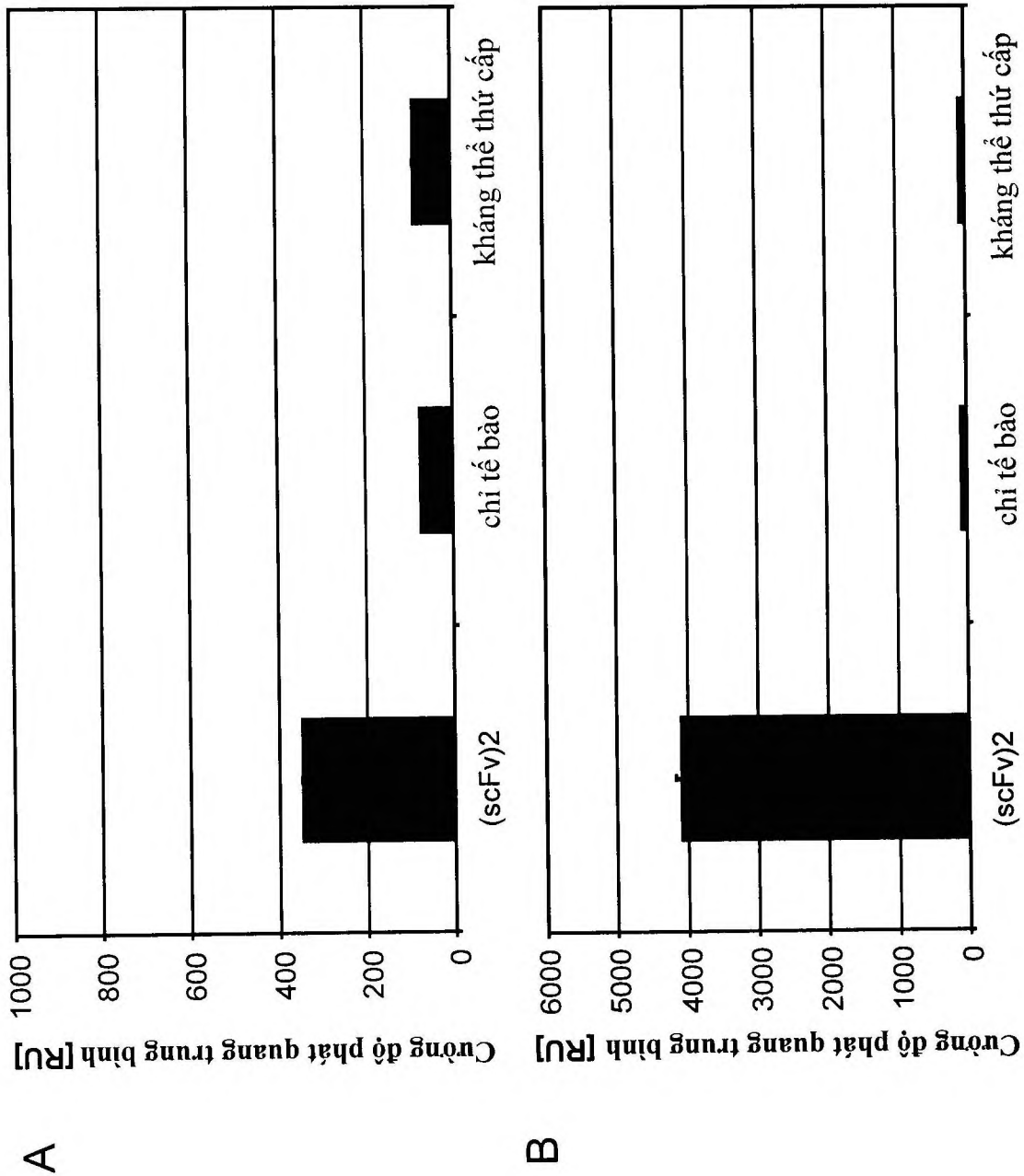


Fig. 19

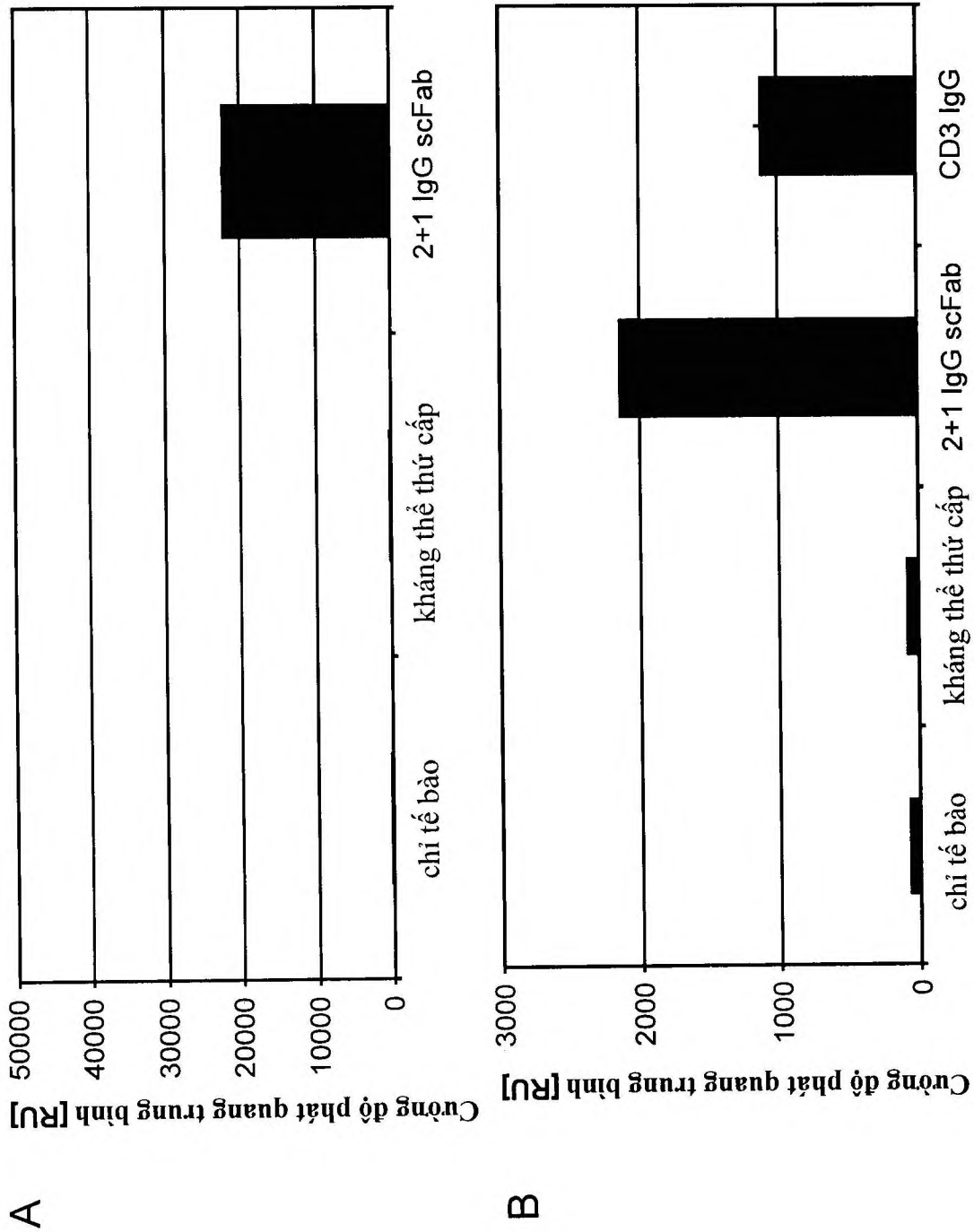


Fig. 20

A

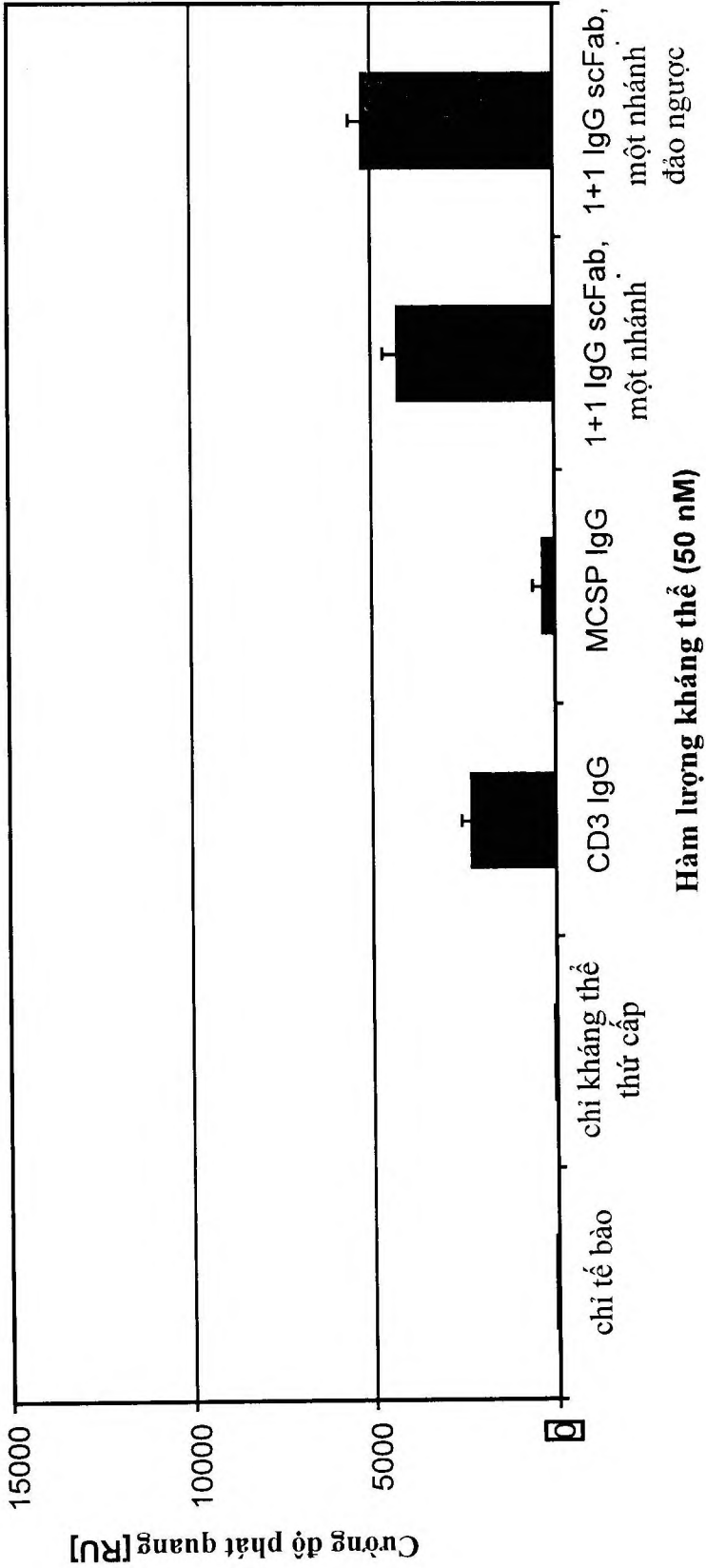


Fig. 21

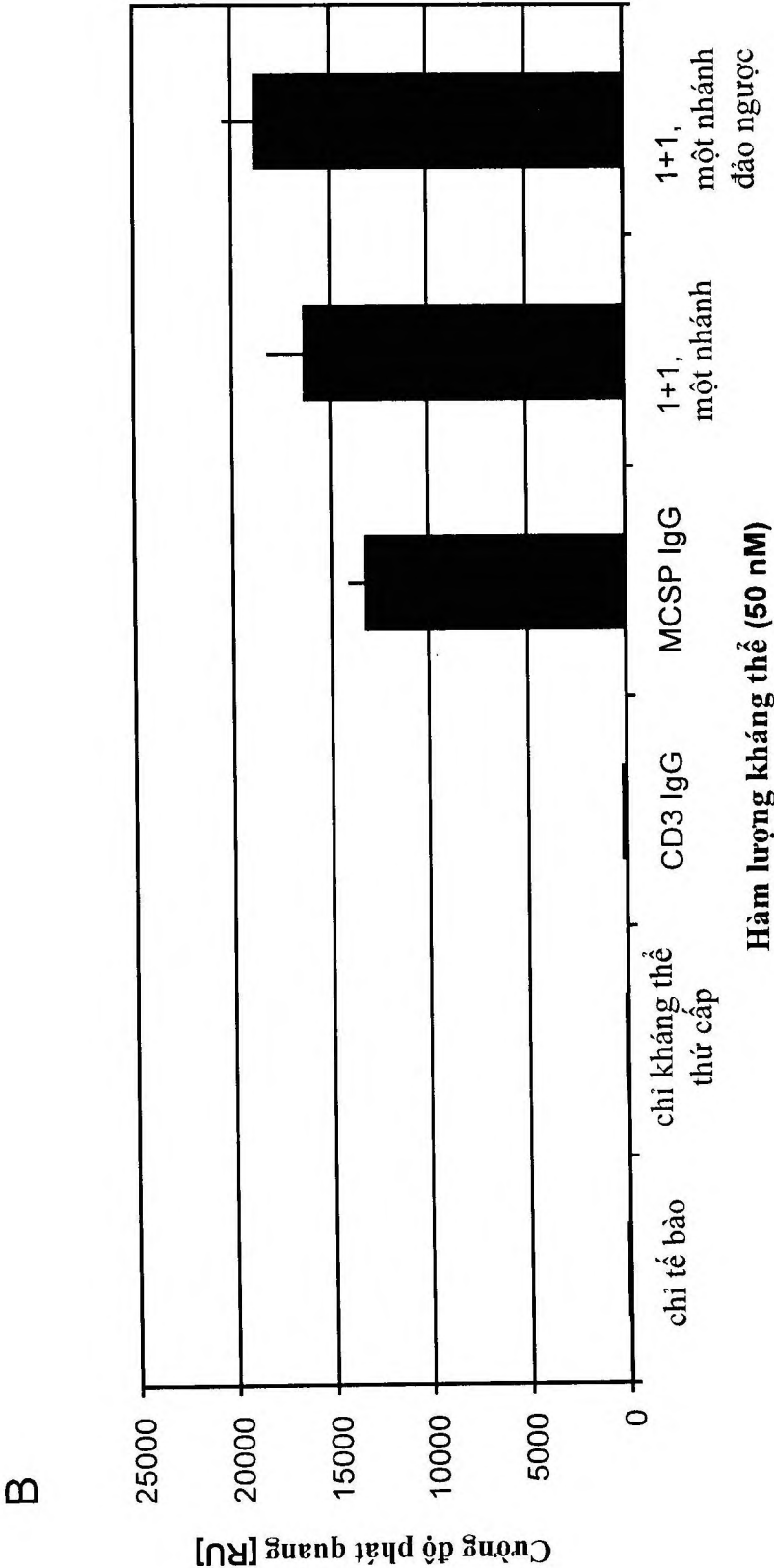


Fig. 21

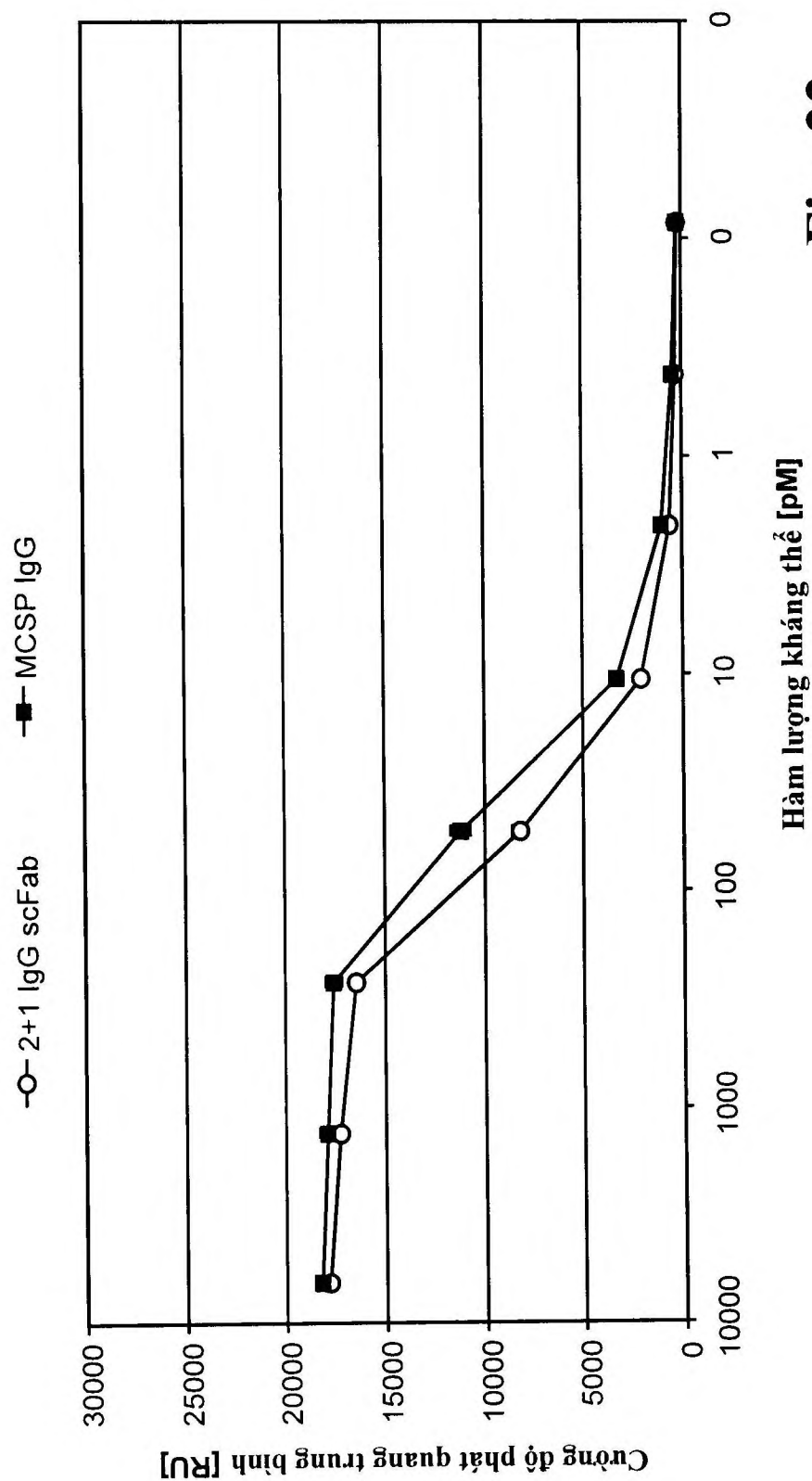


Fig. 22

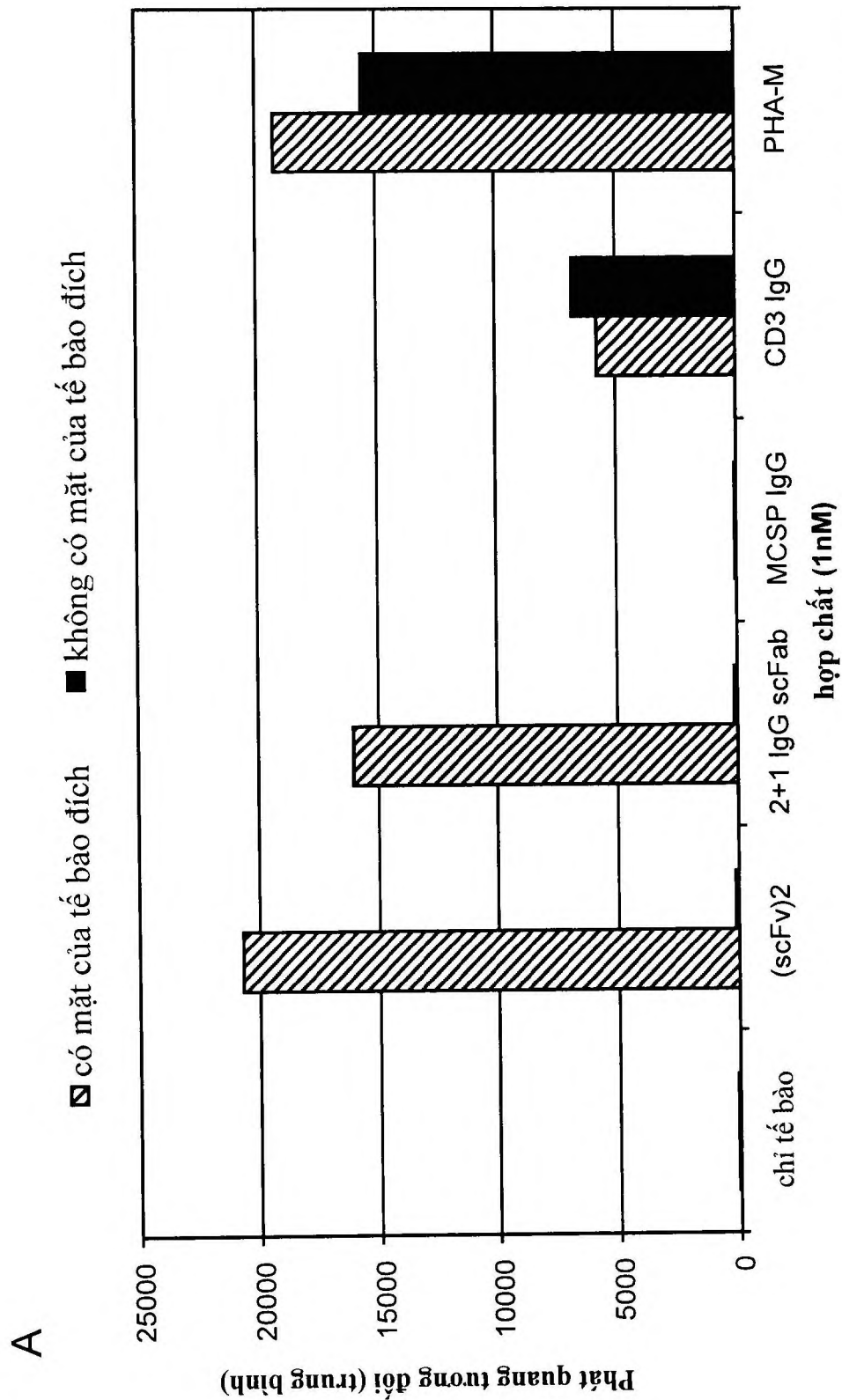


Fig. 23

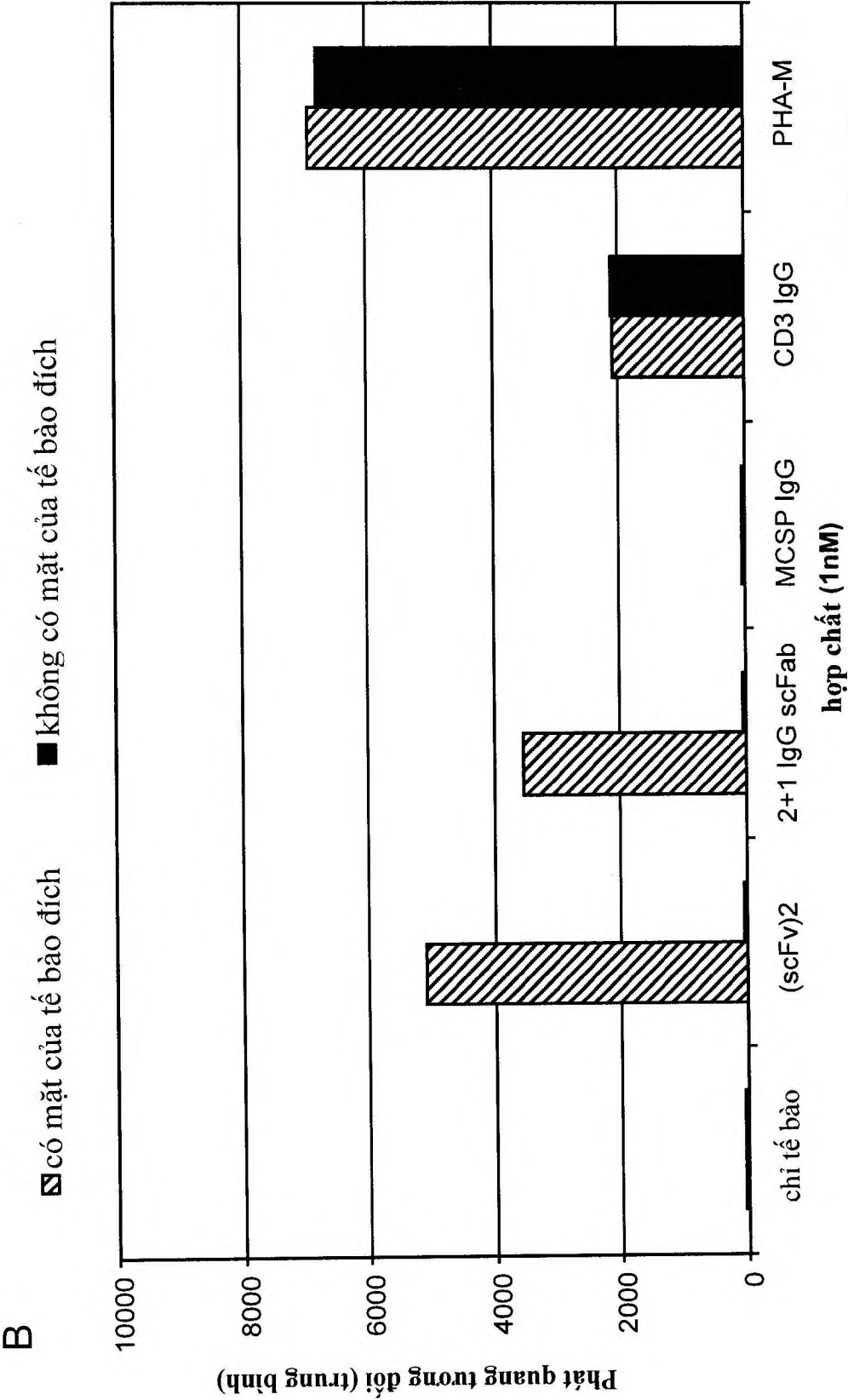


Fig. 23

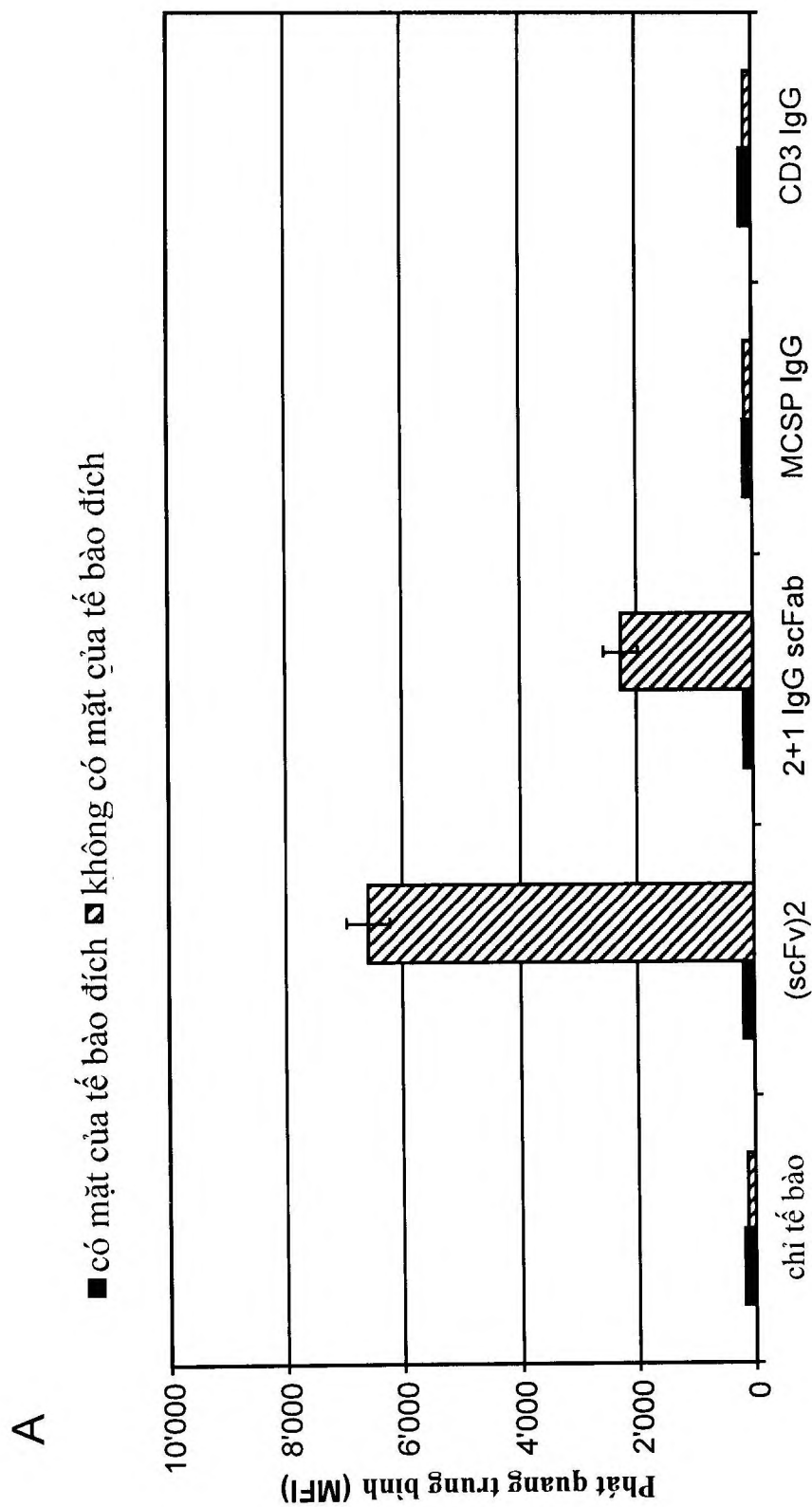


Fig. 24

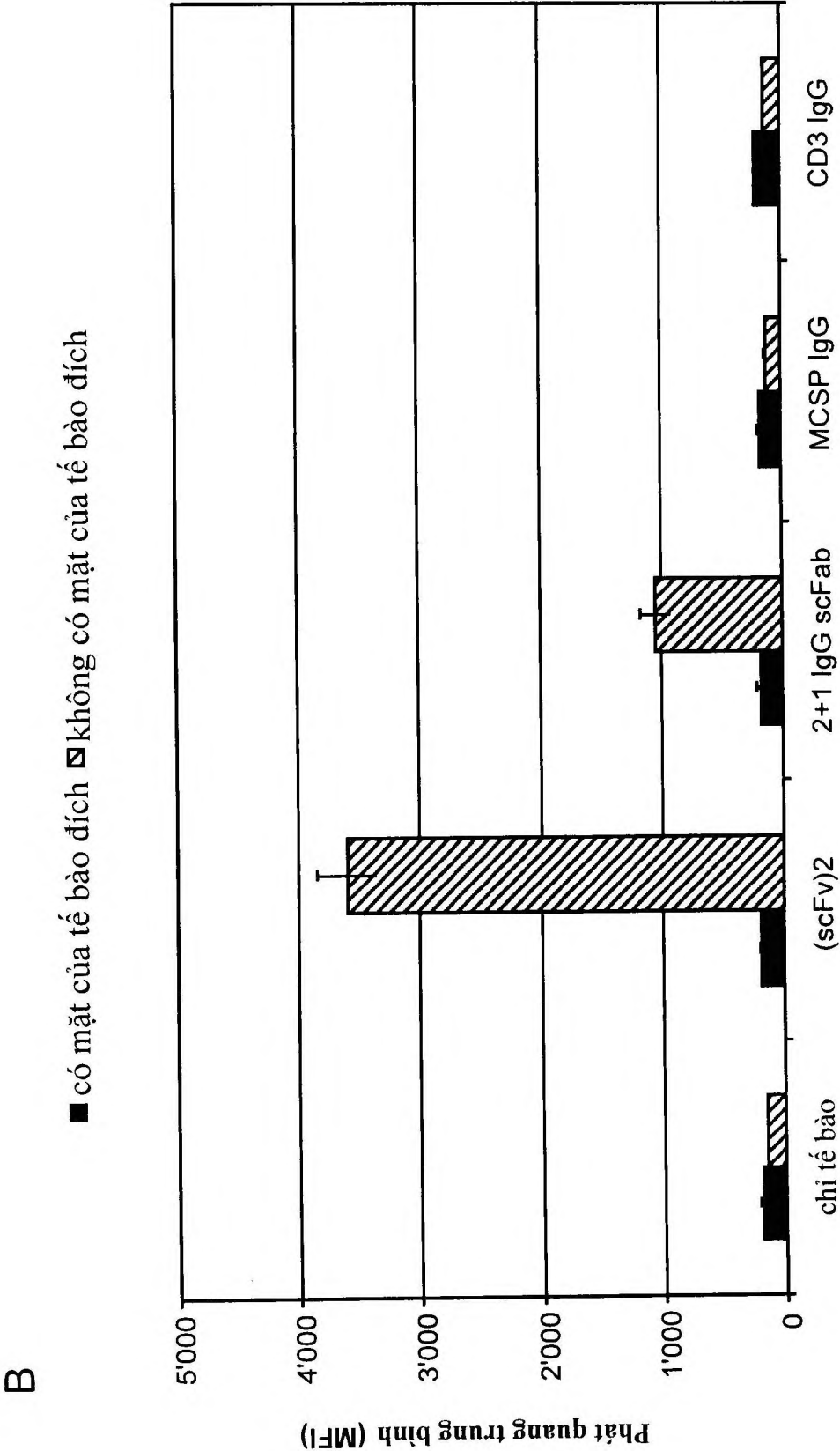


Fig. 24

Fig. 25

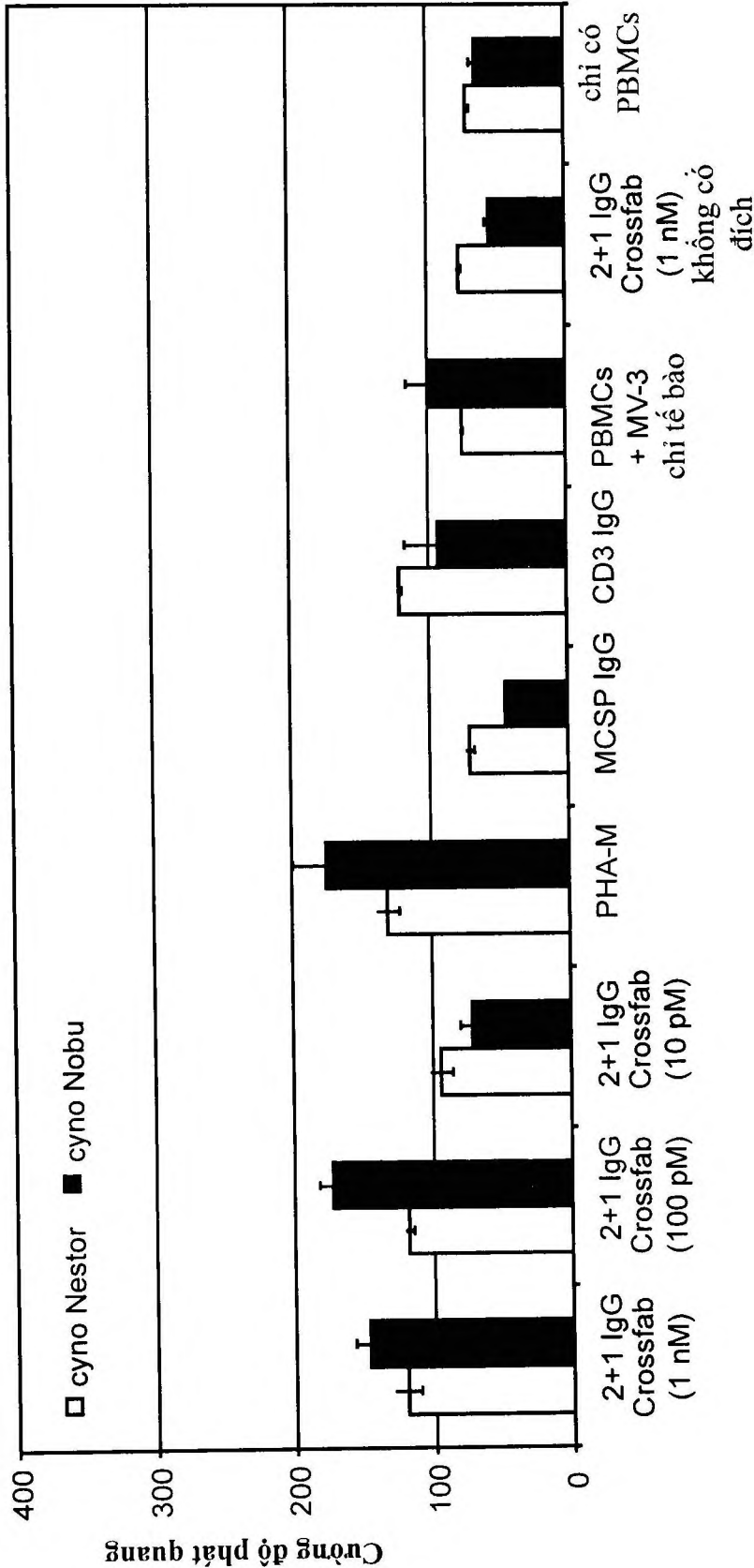


Fig. 26

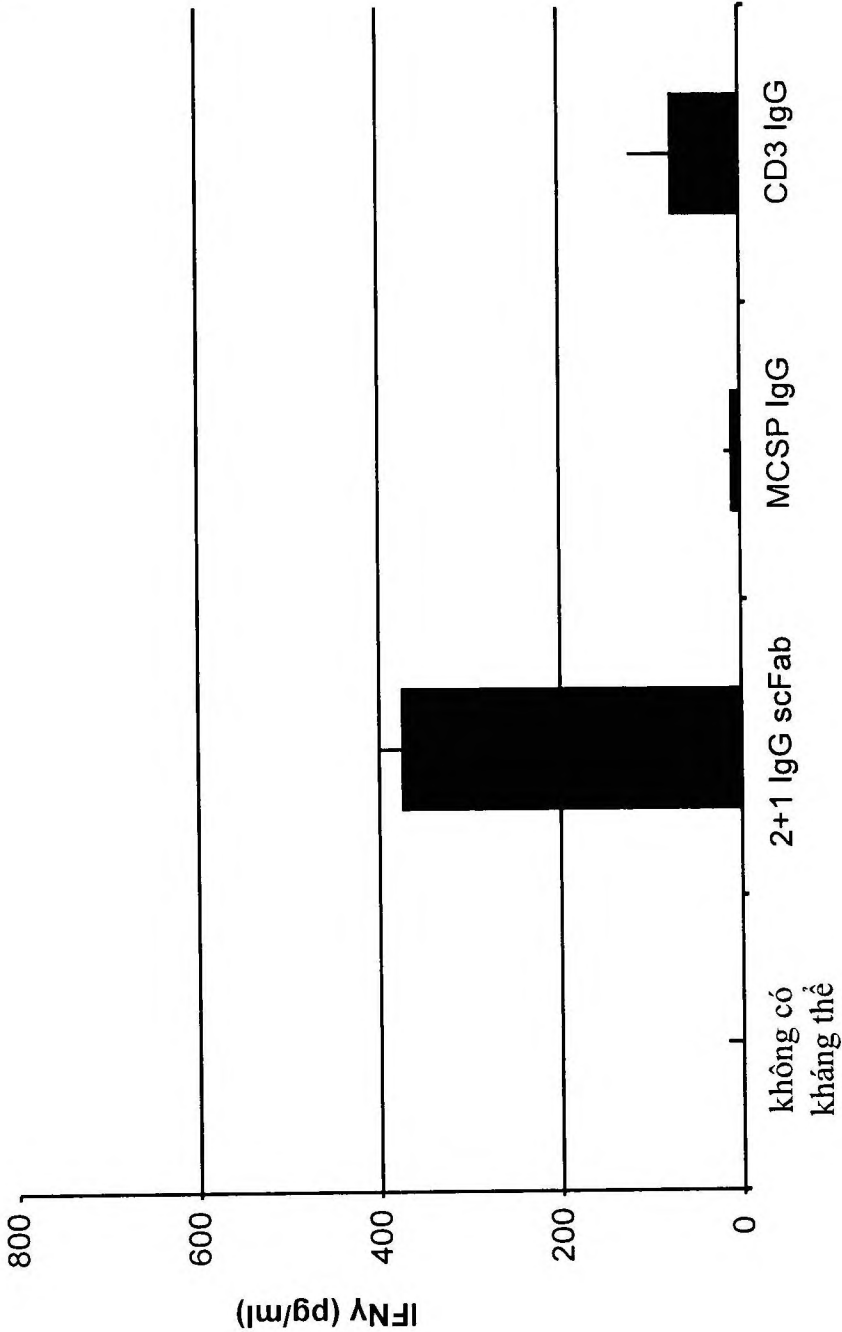


Fig. 27

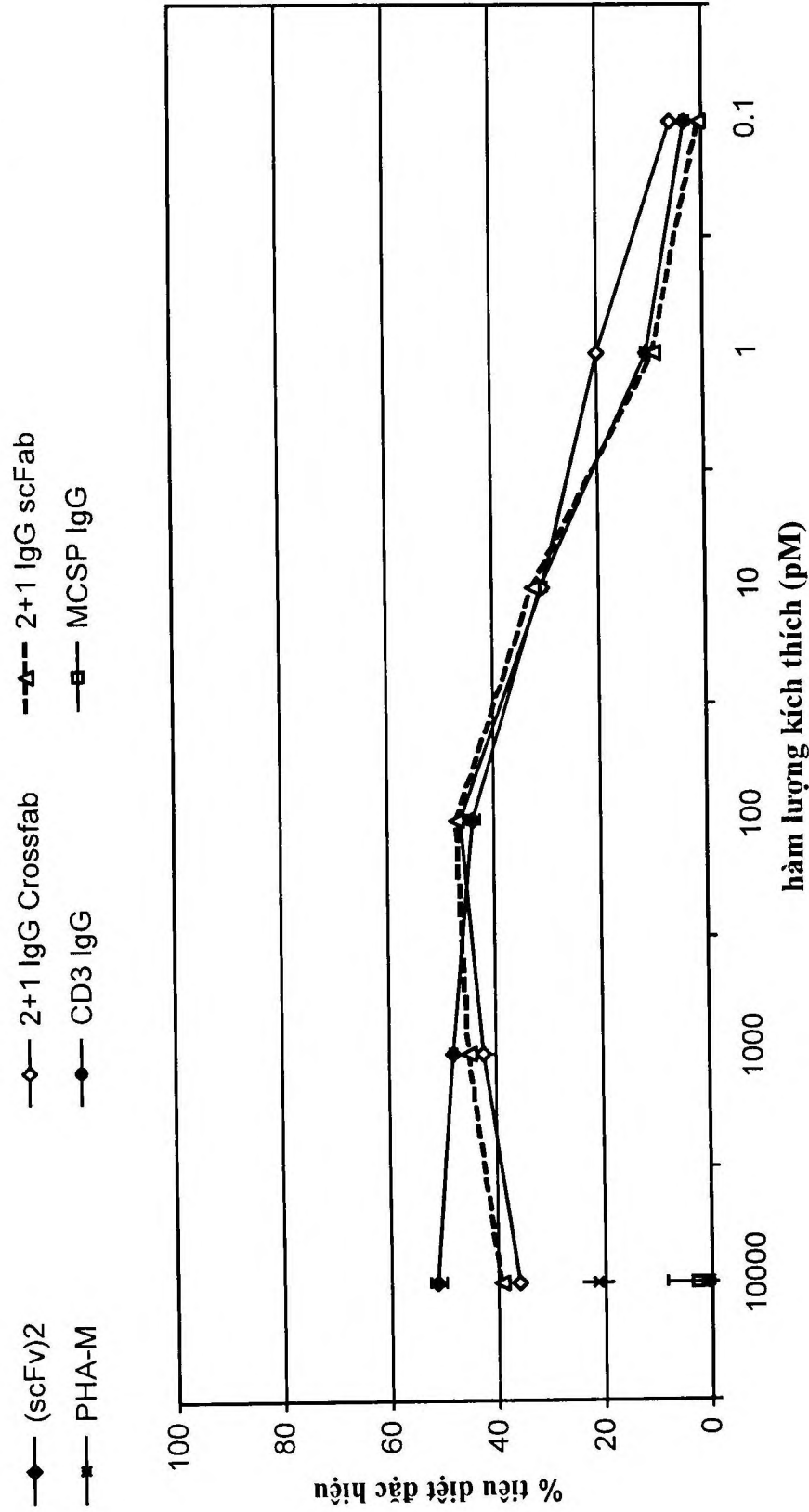


Fig. 28

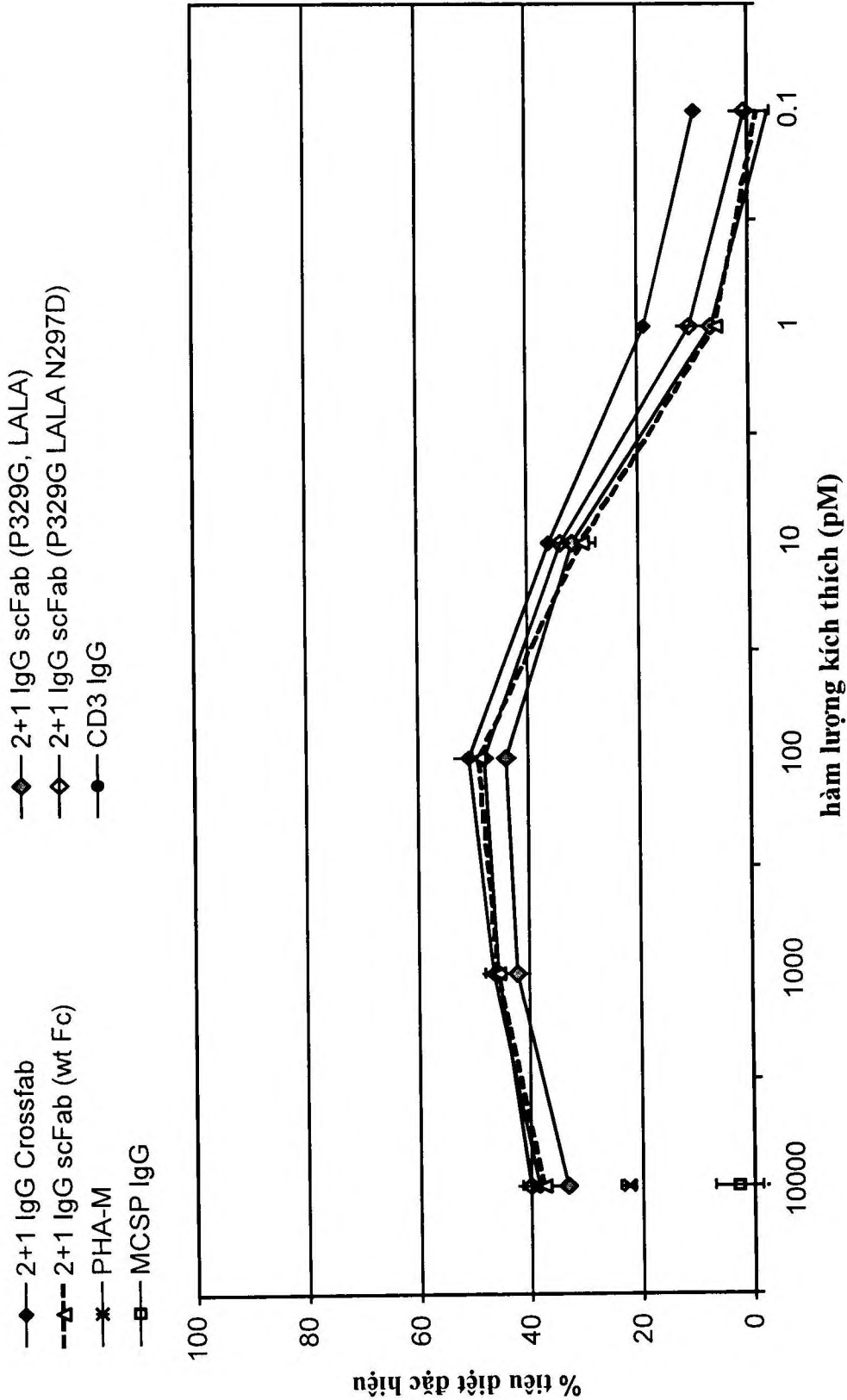


Fig. 29

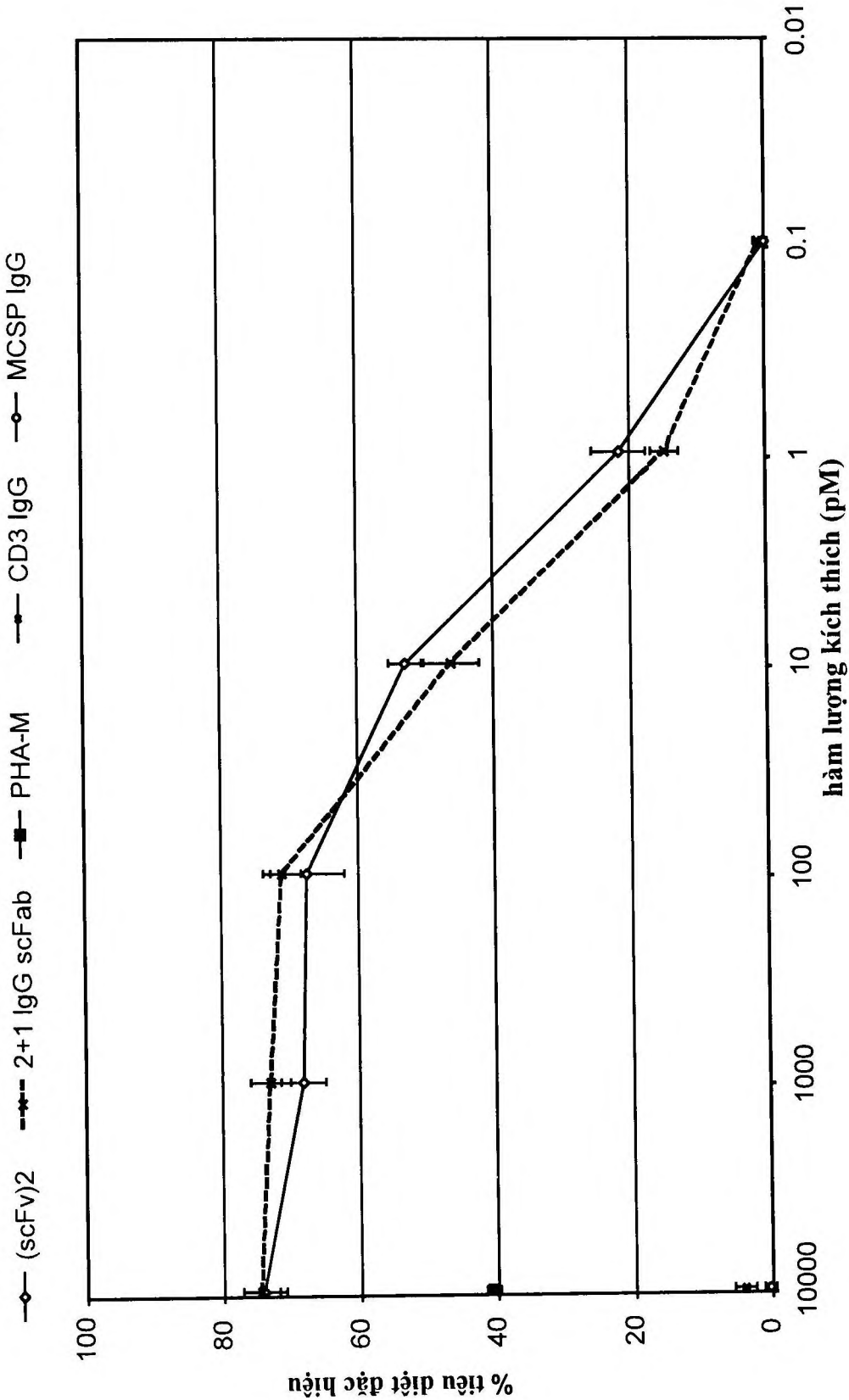


Fig. 30

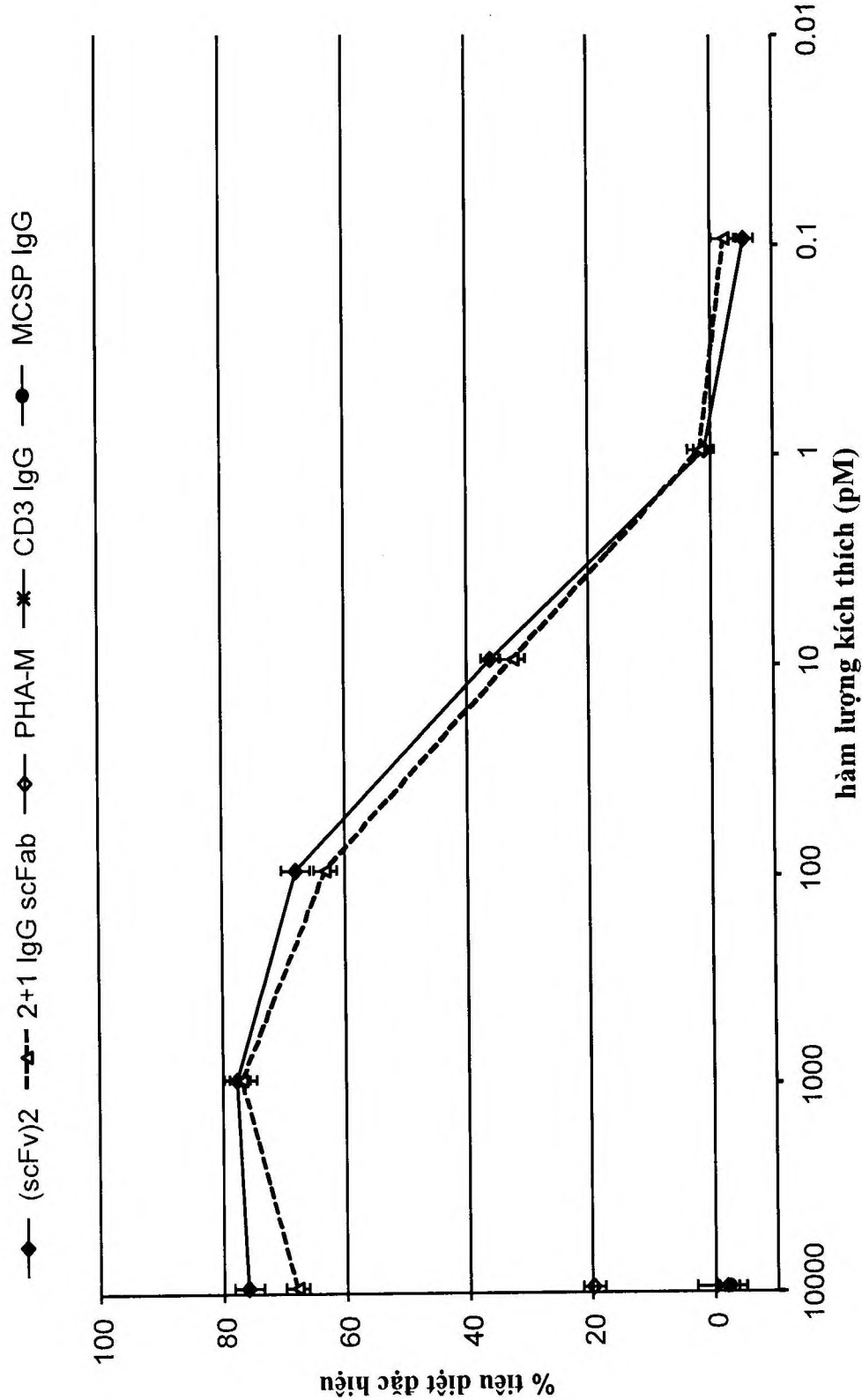


Fig. 31

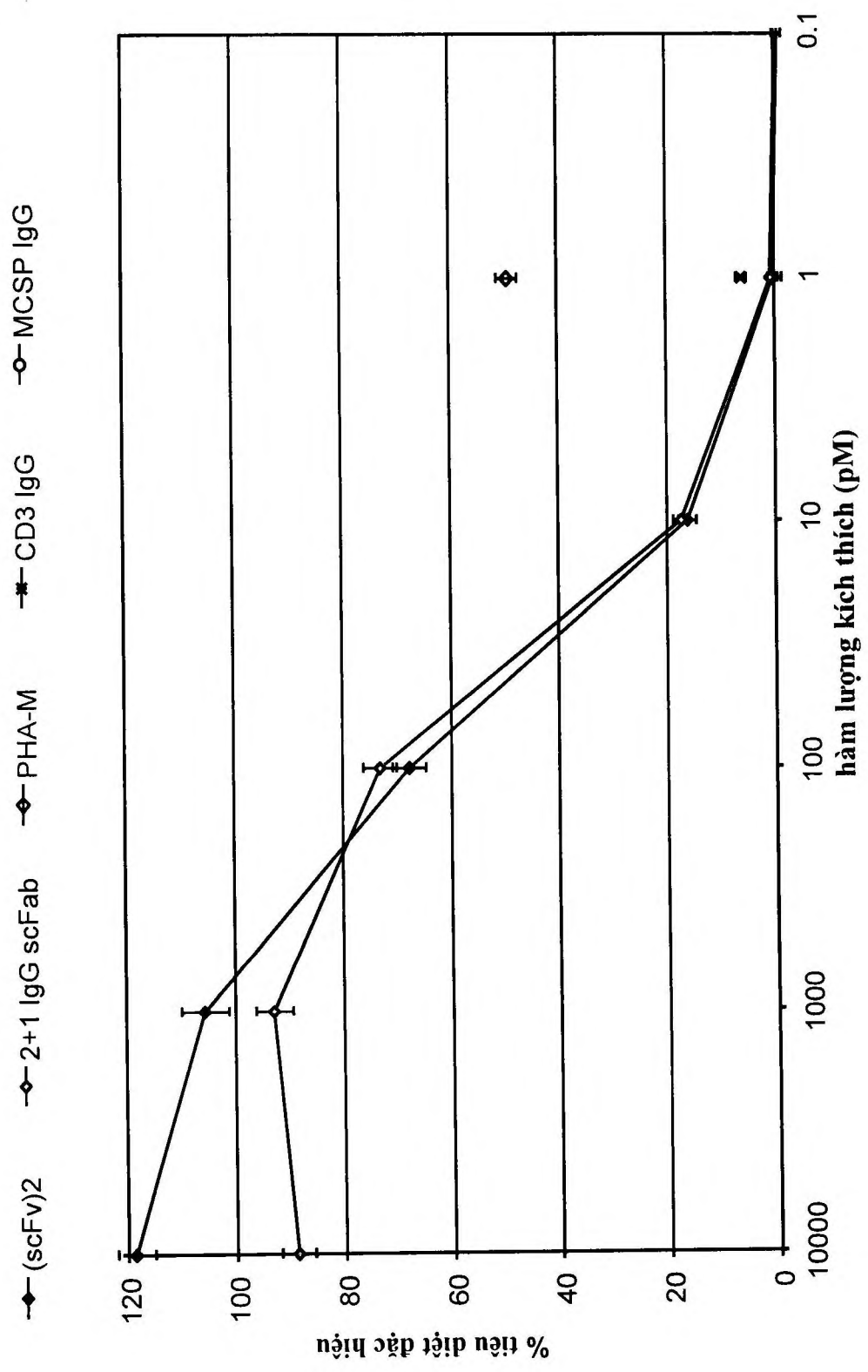


Fig. 32

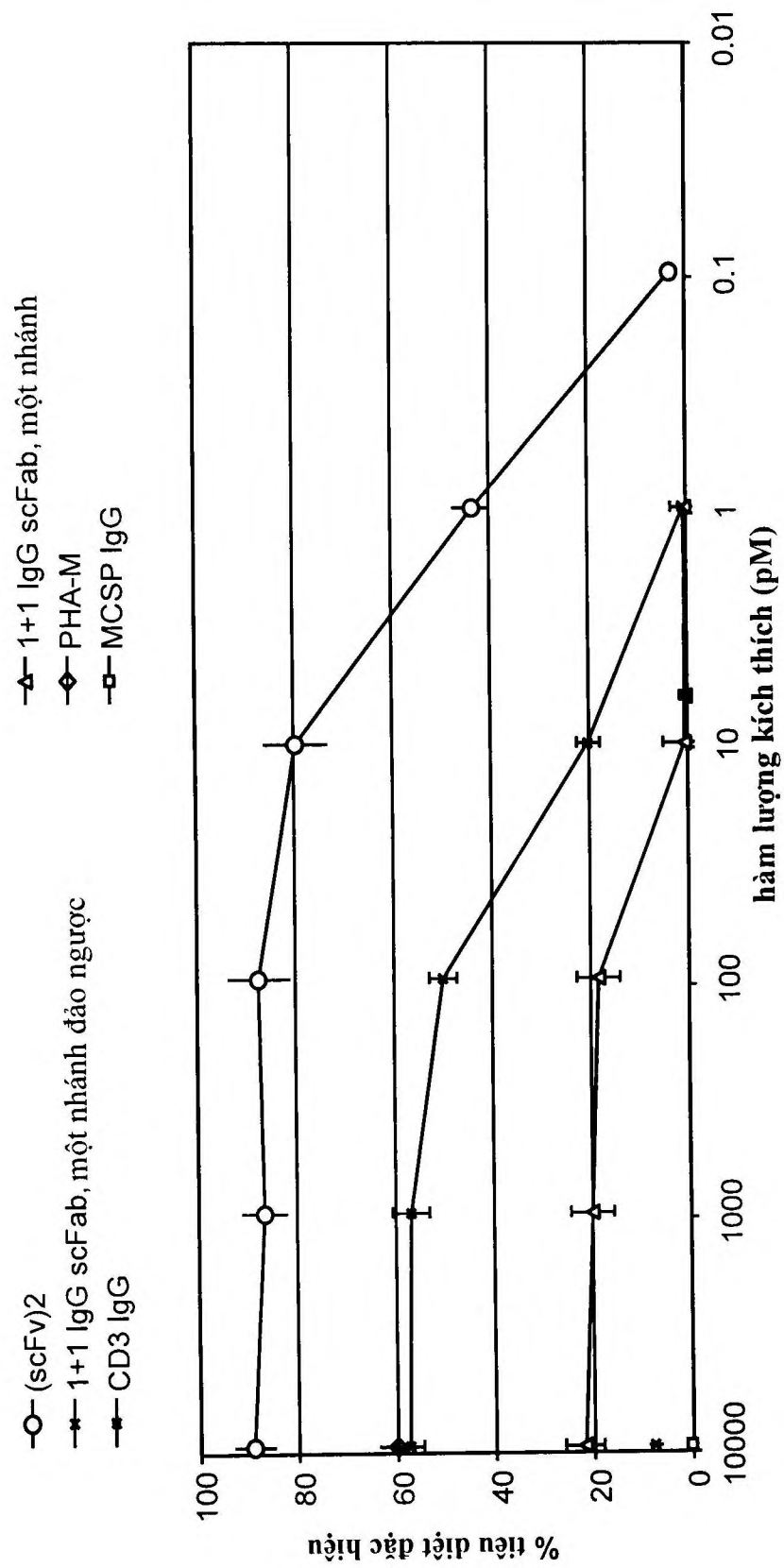


Fig. 33

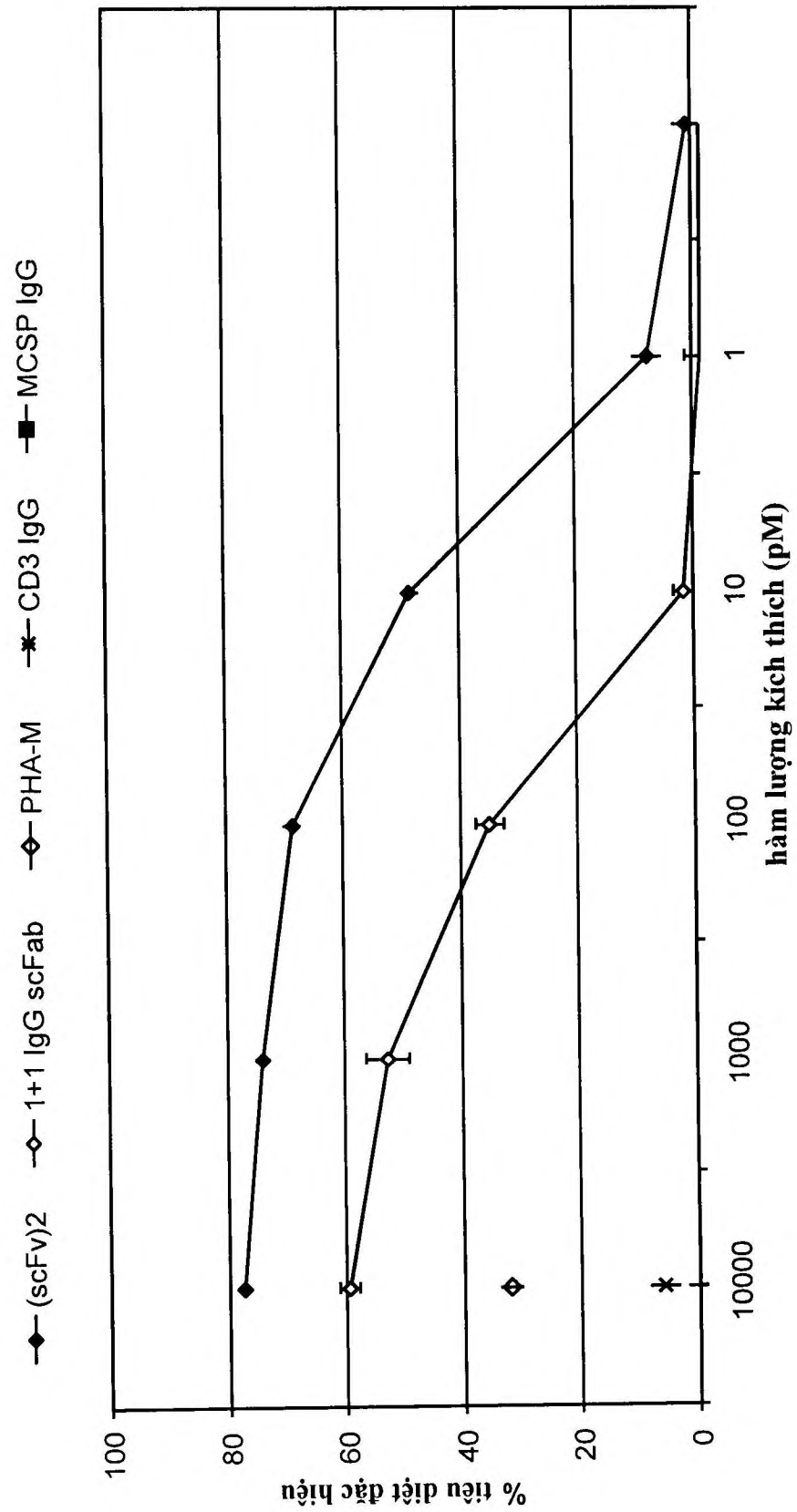


Fig. 34

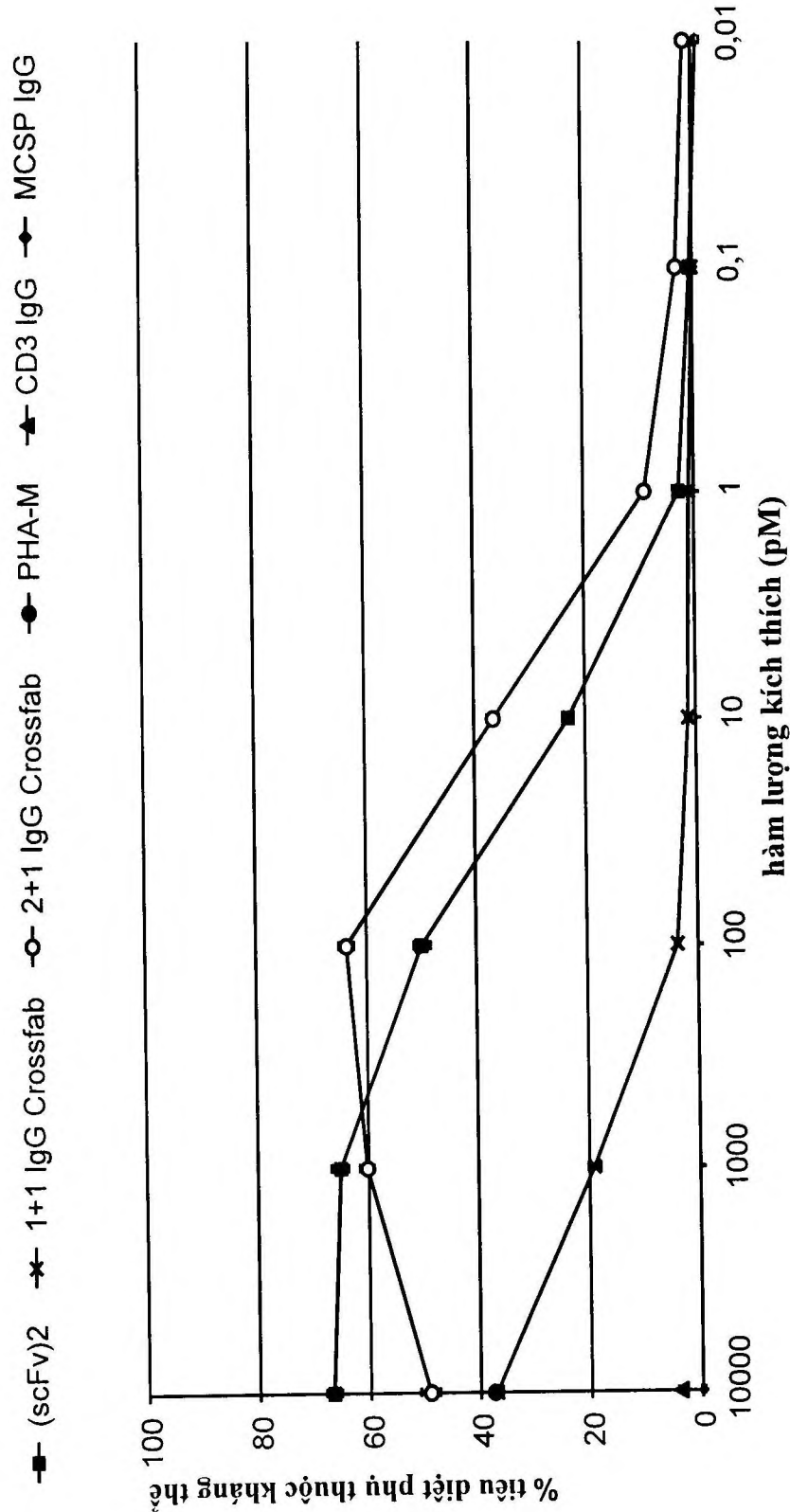


Fig. 35

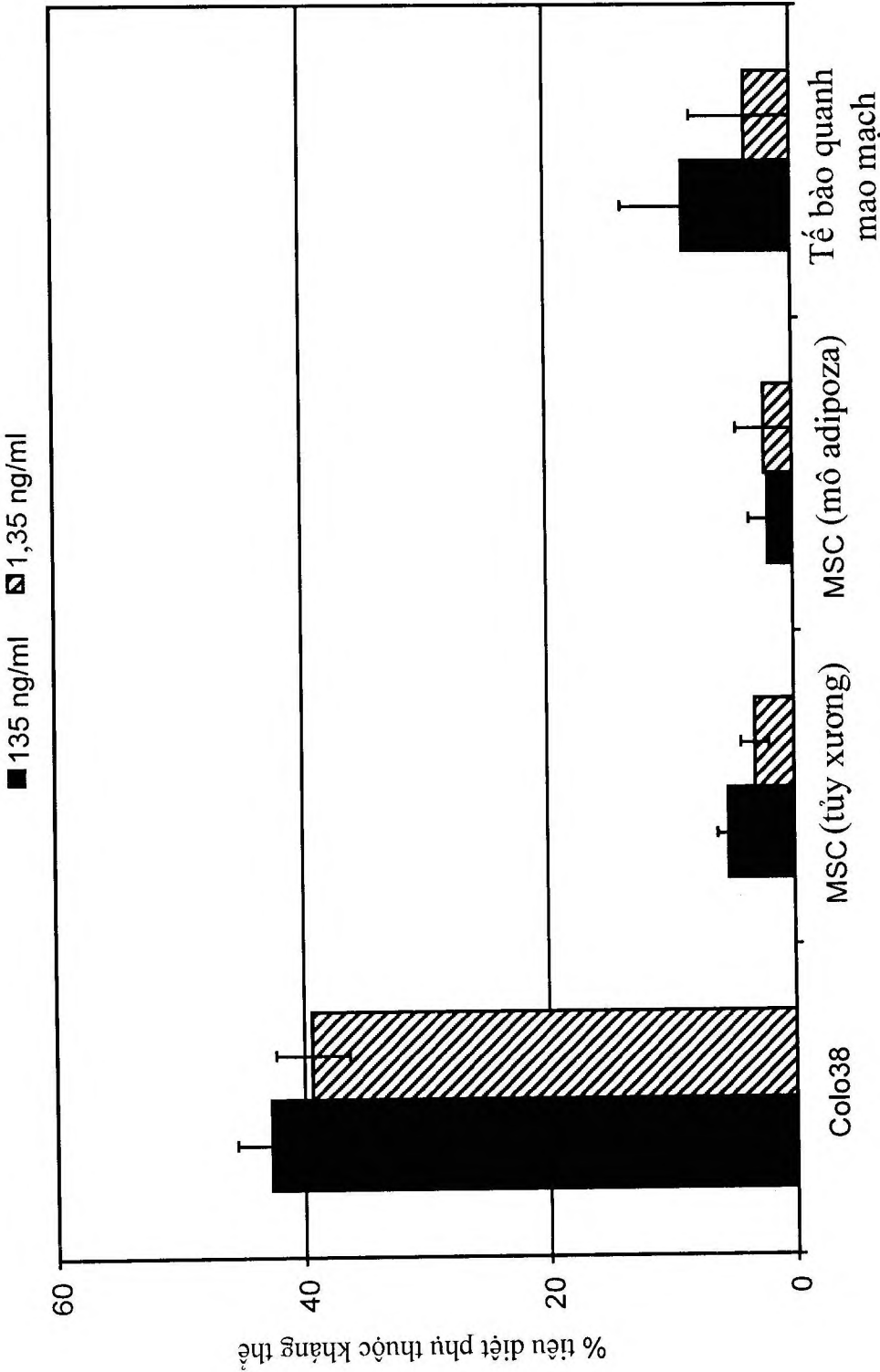


Fig. 36

A

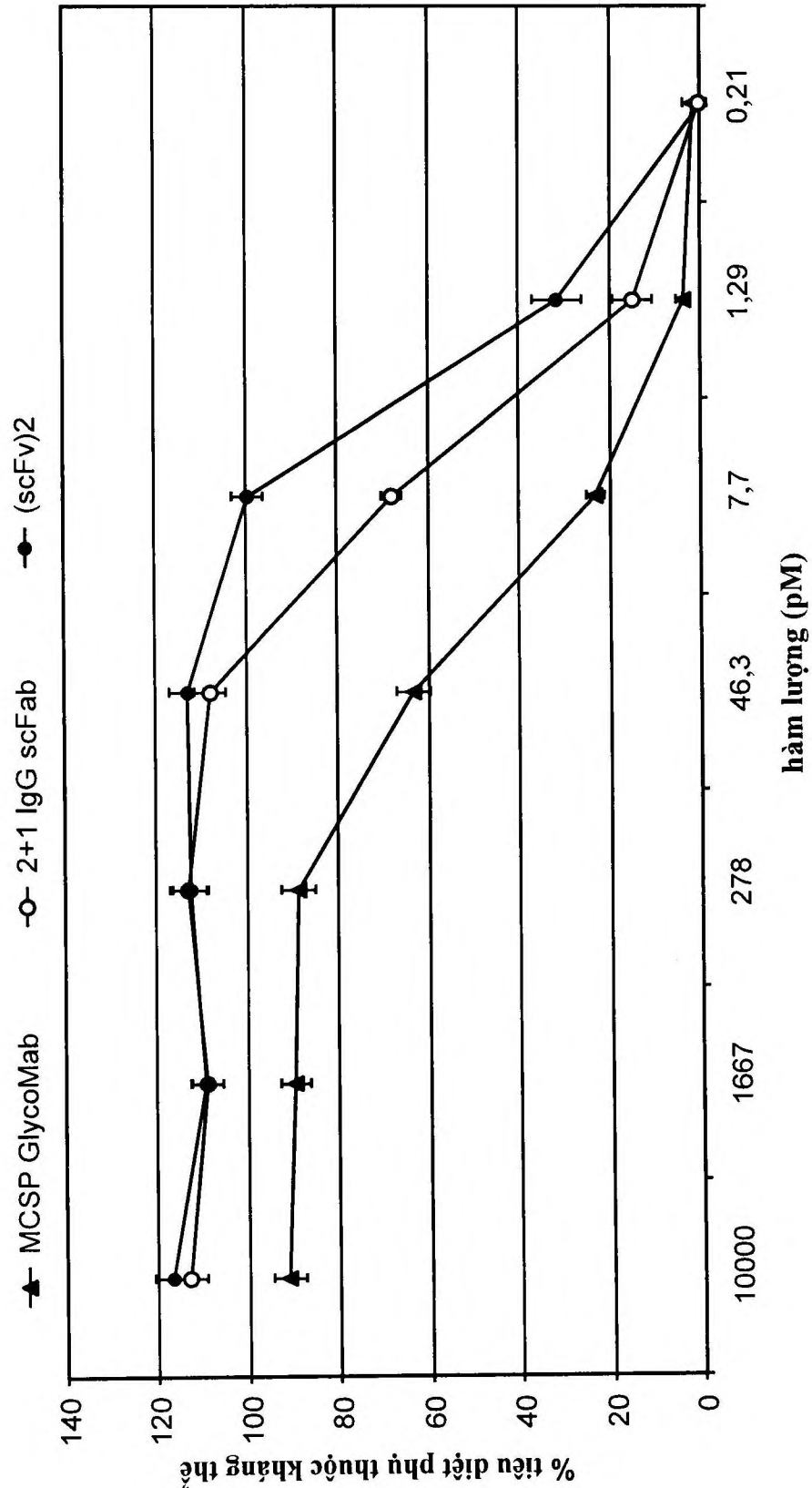


Fig. 36

B

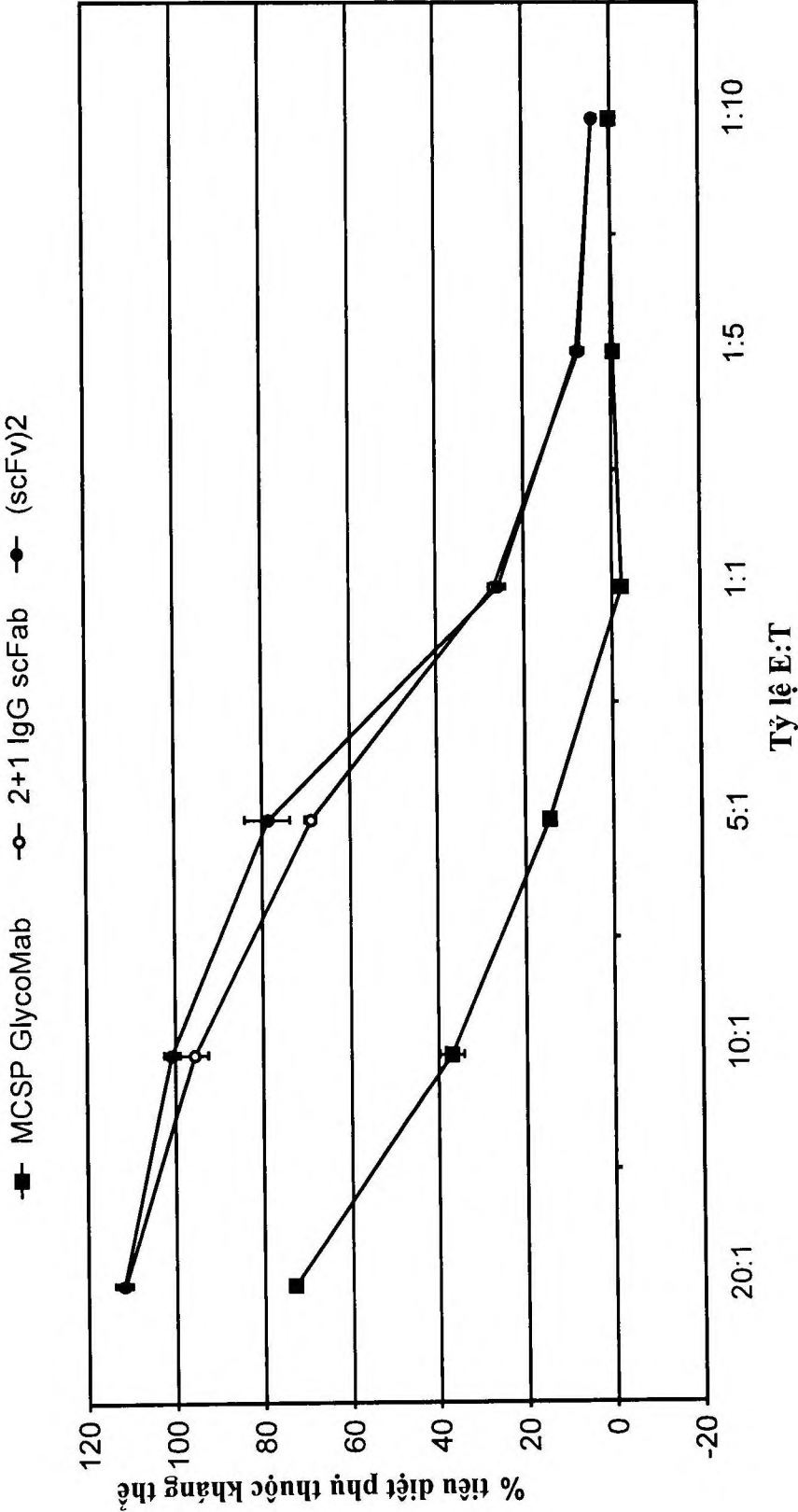


Fig. 37

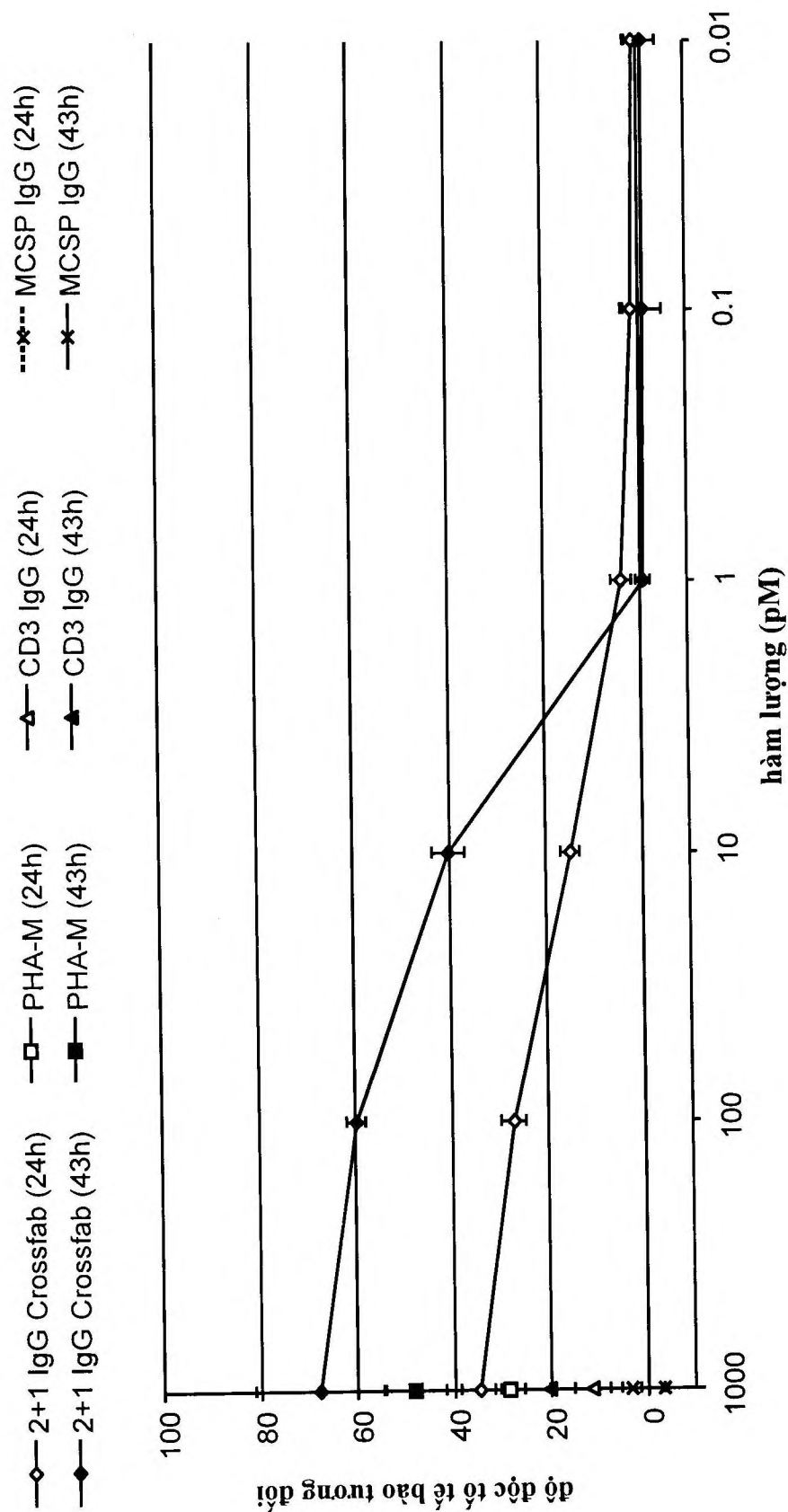


Fig. 38

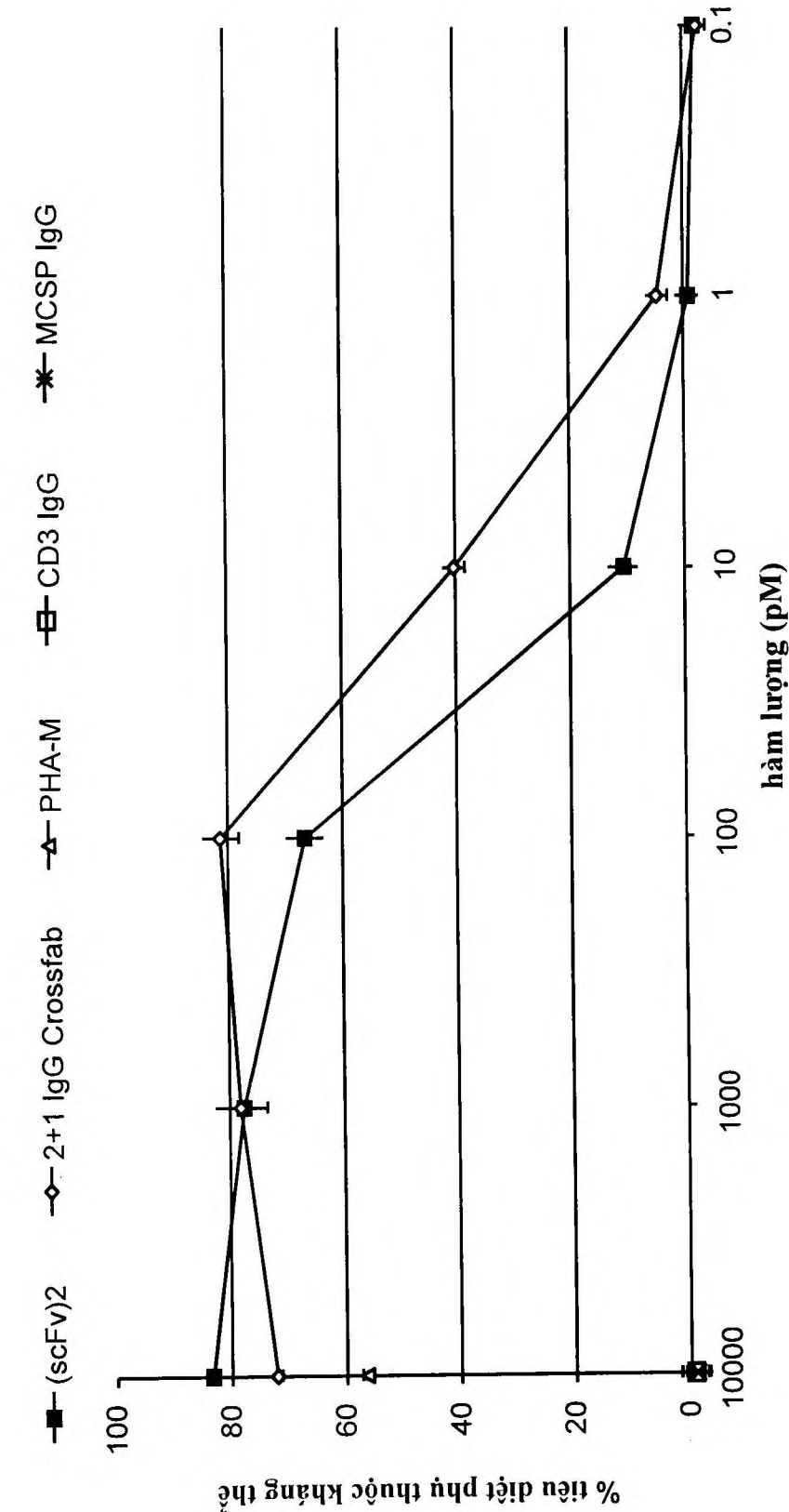


Fig. 39

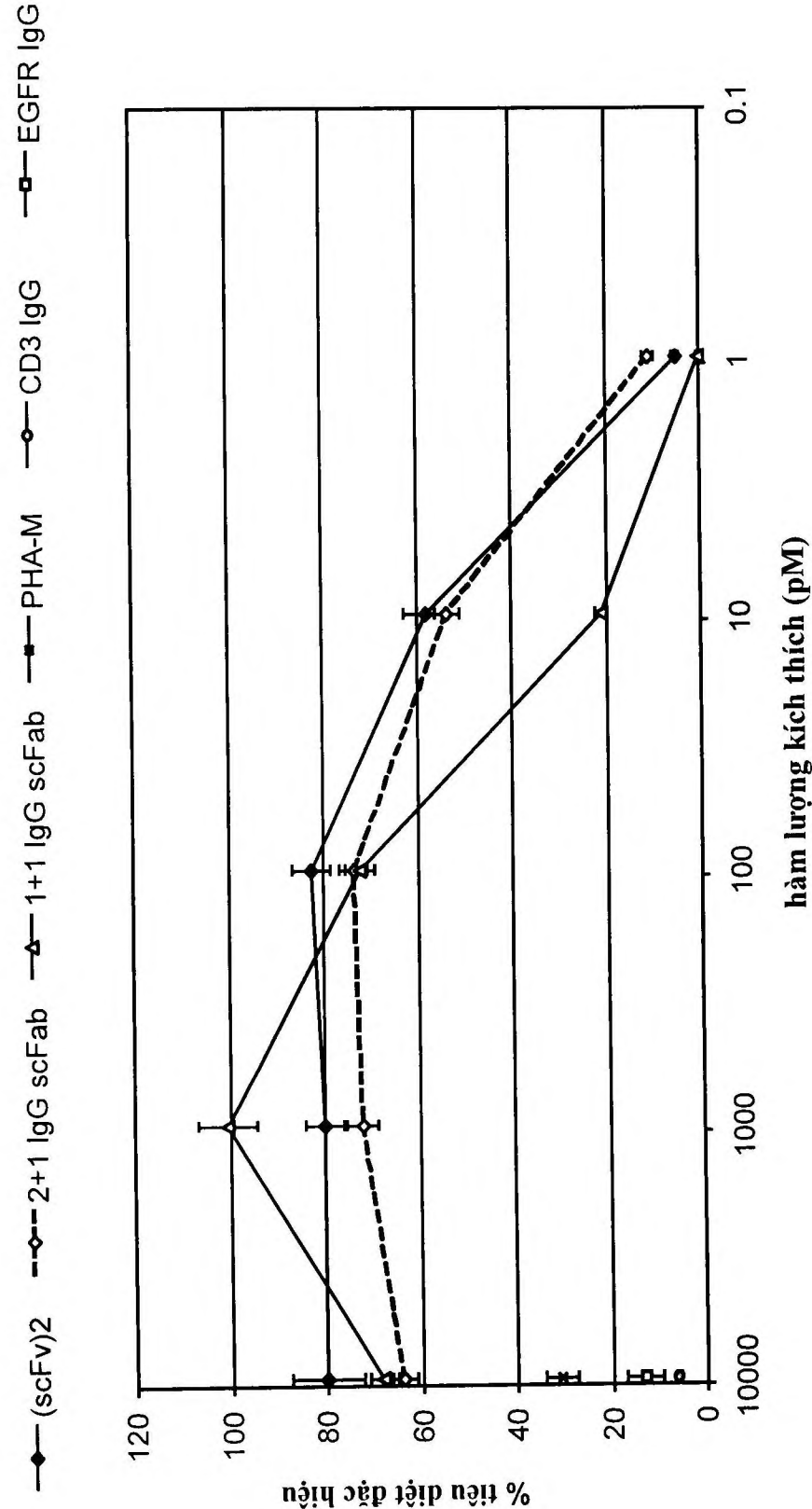


Fig. 40

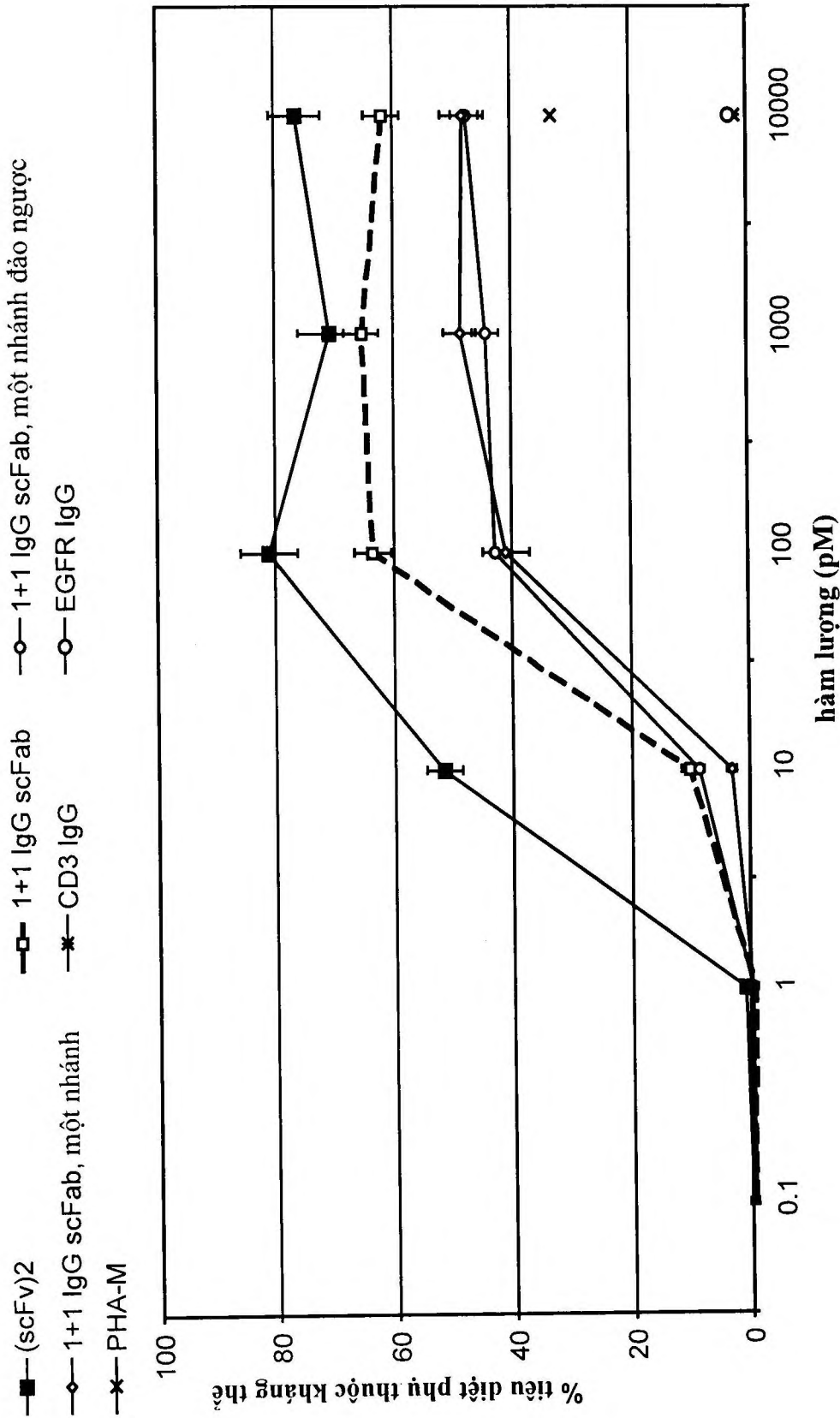


Fig. 41

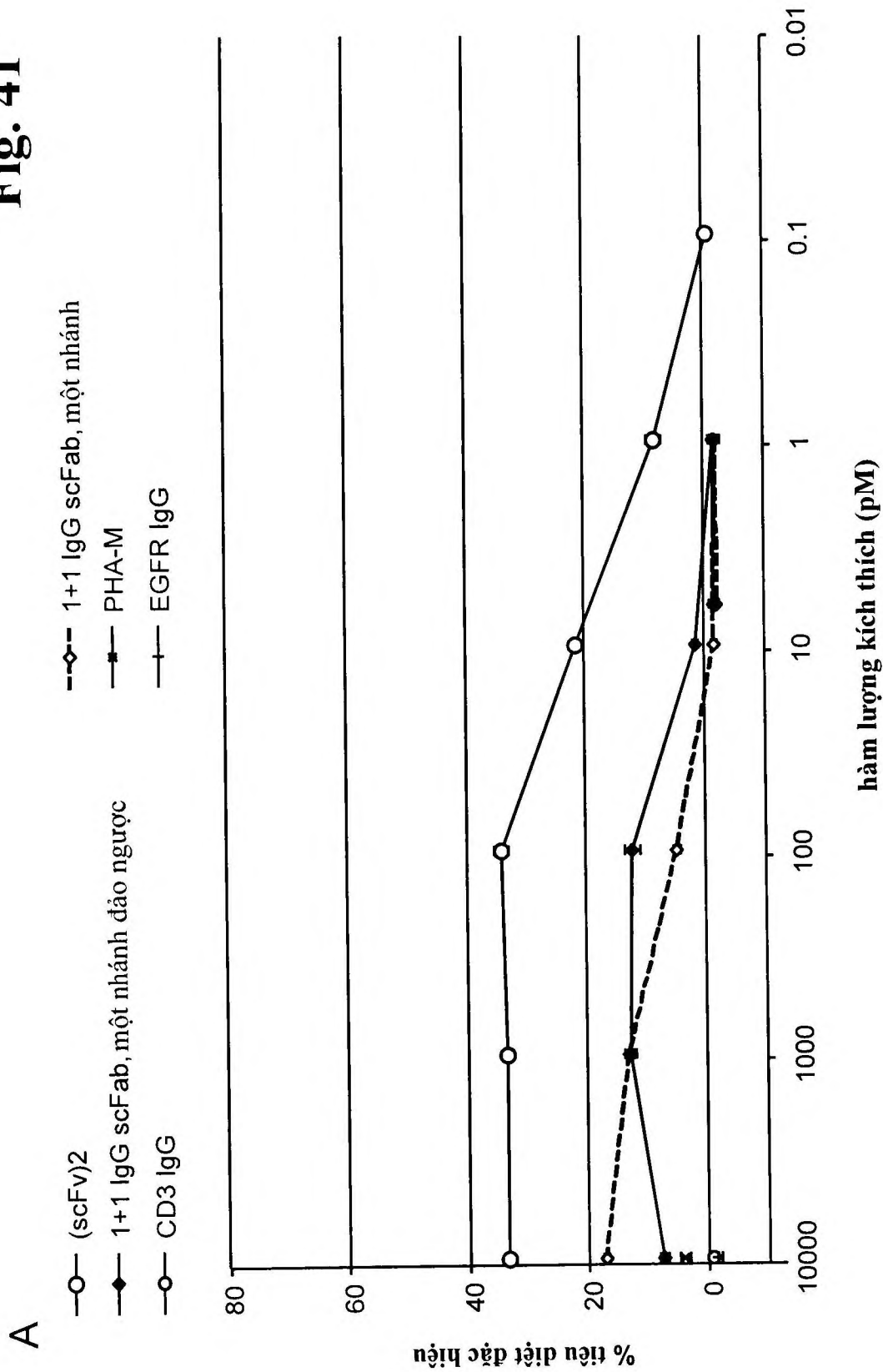


Fig. 41

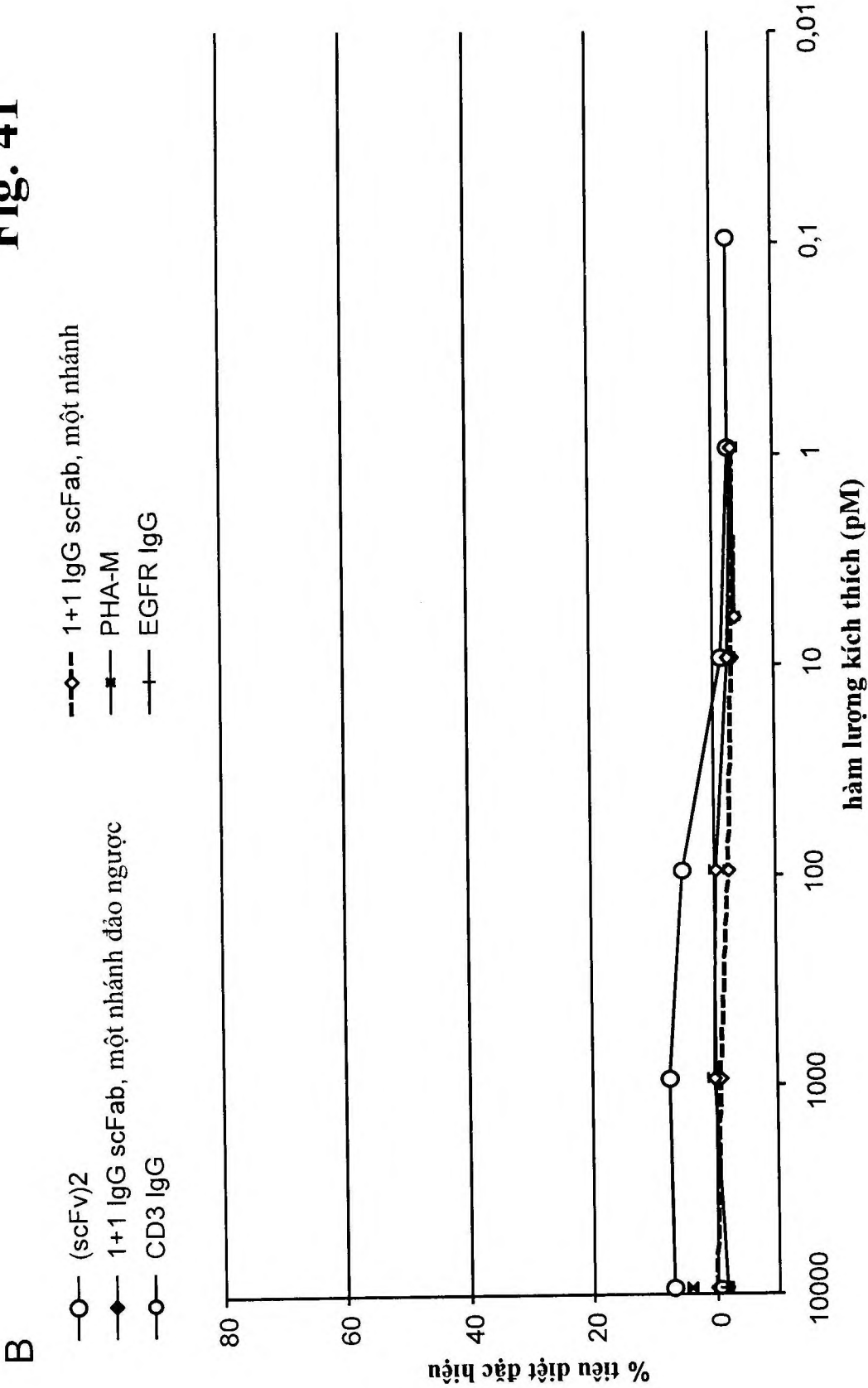
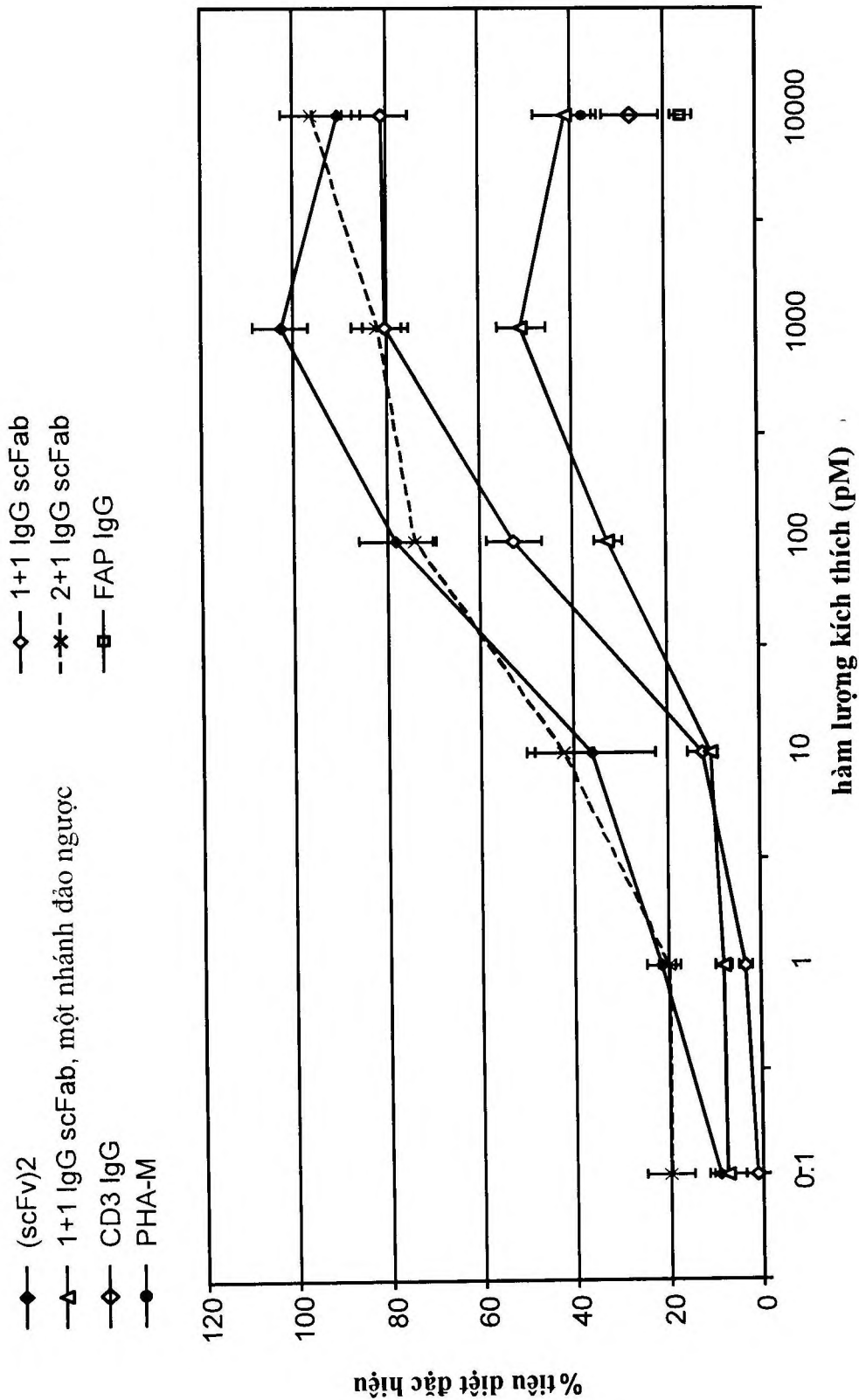


Fig. 42



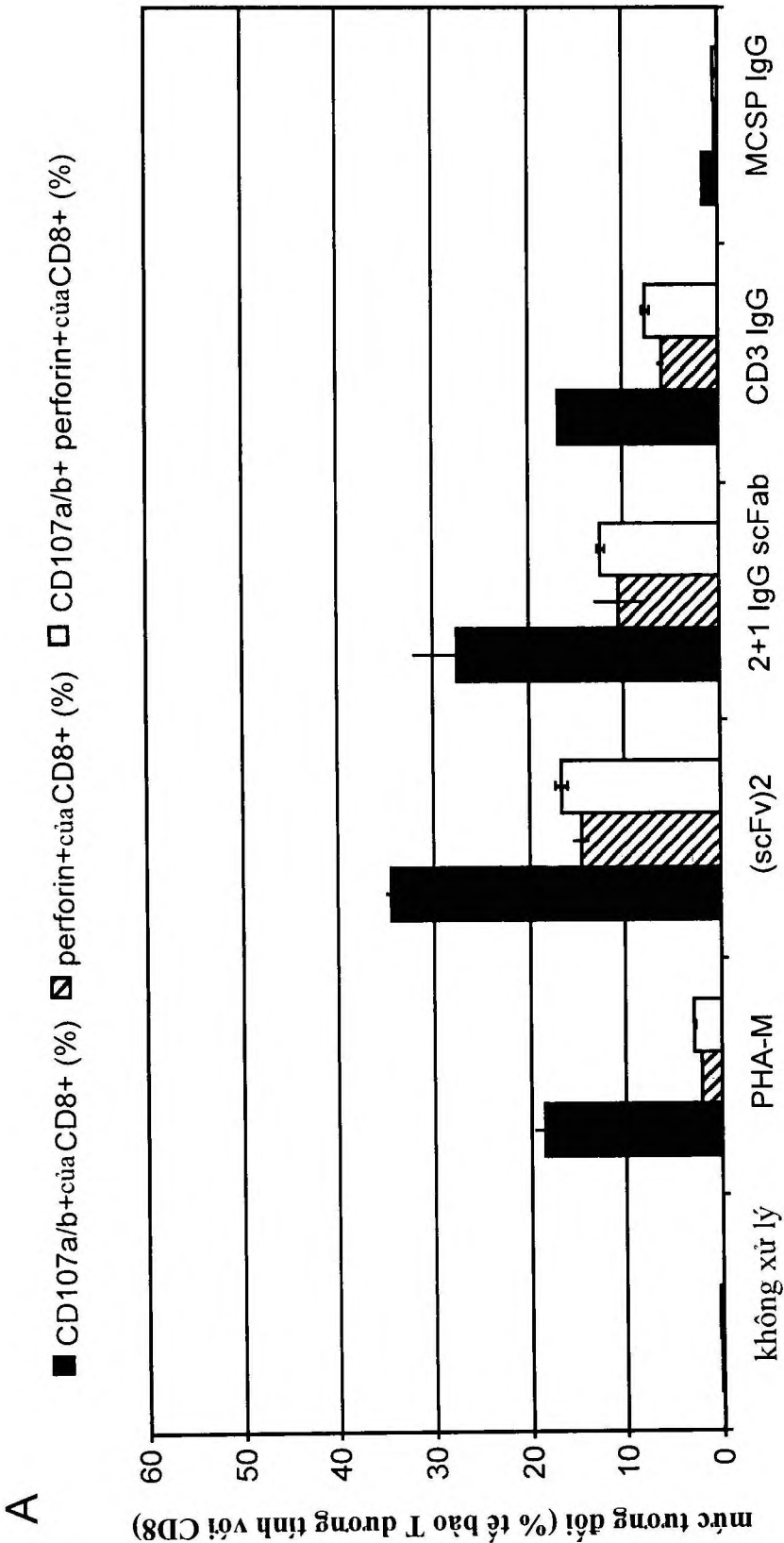


Fig. 43

B

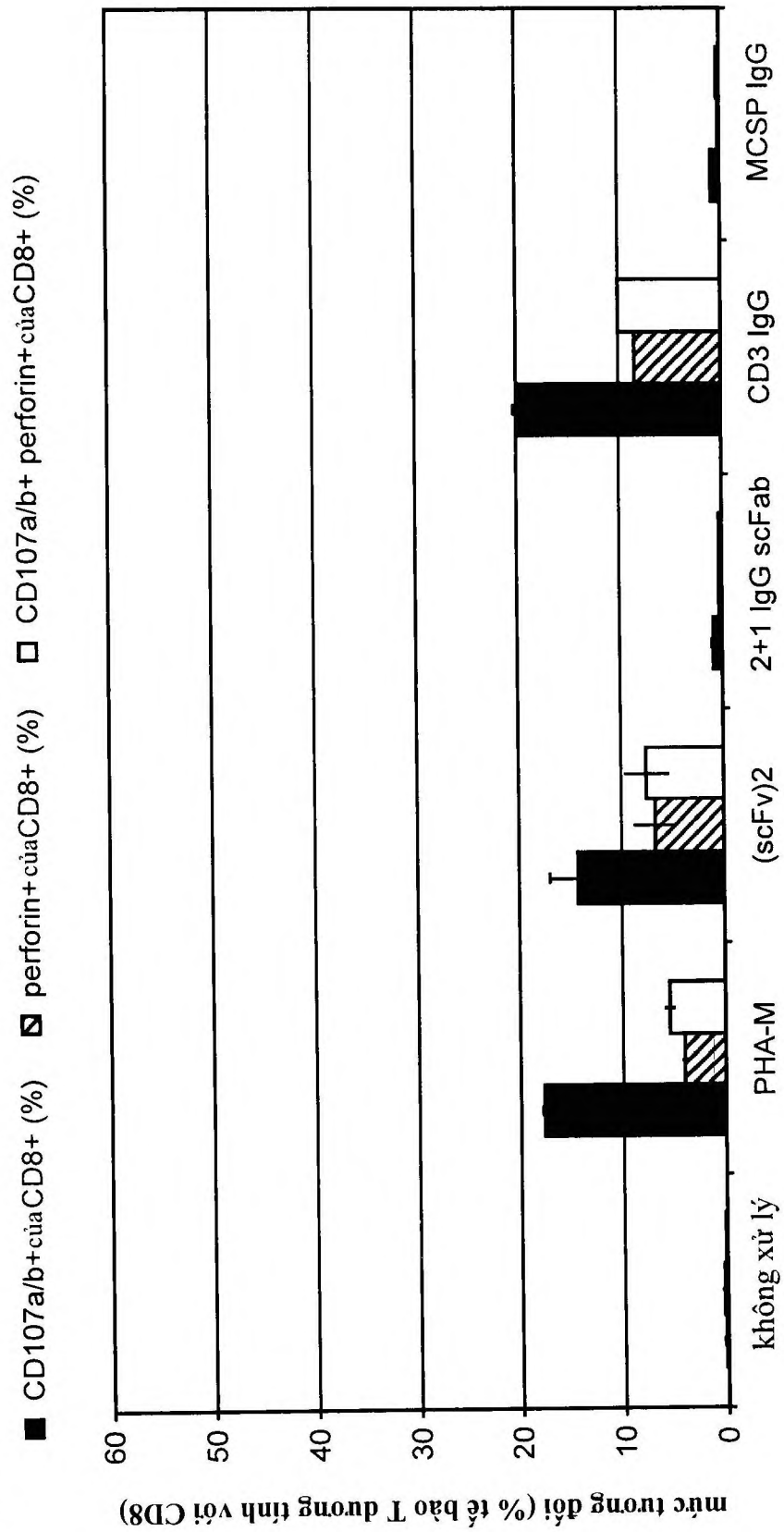


Fig. 43

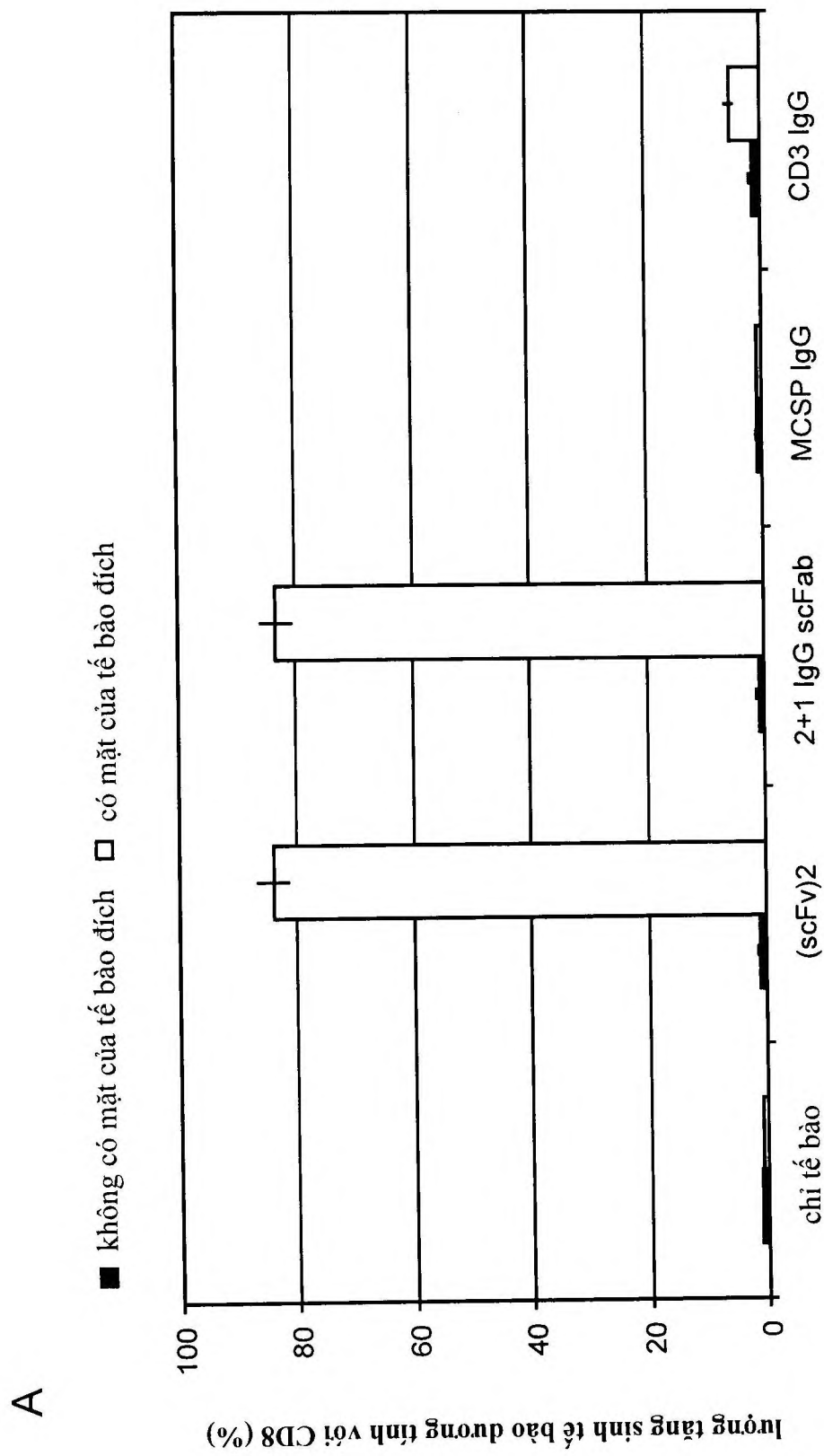


Fig. 44

Fig. 44

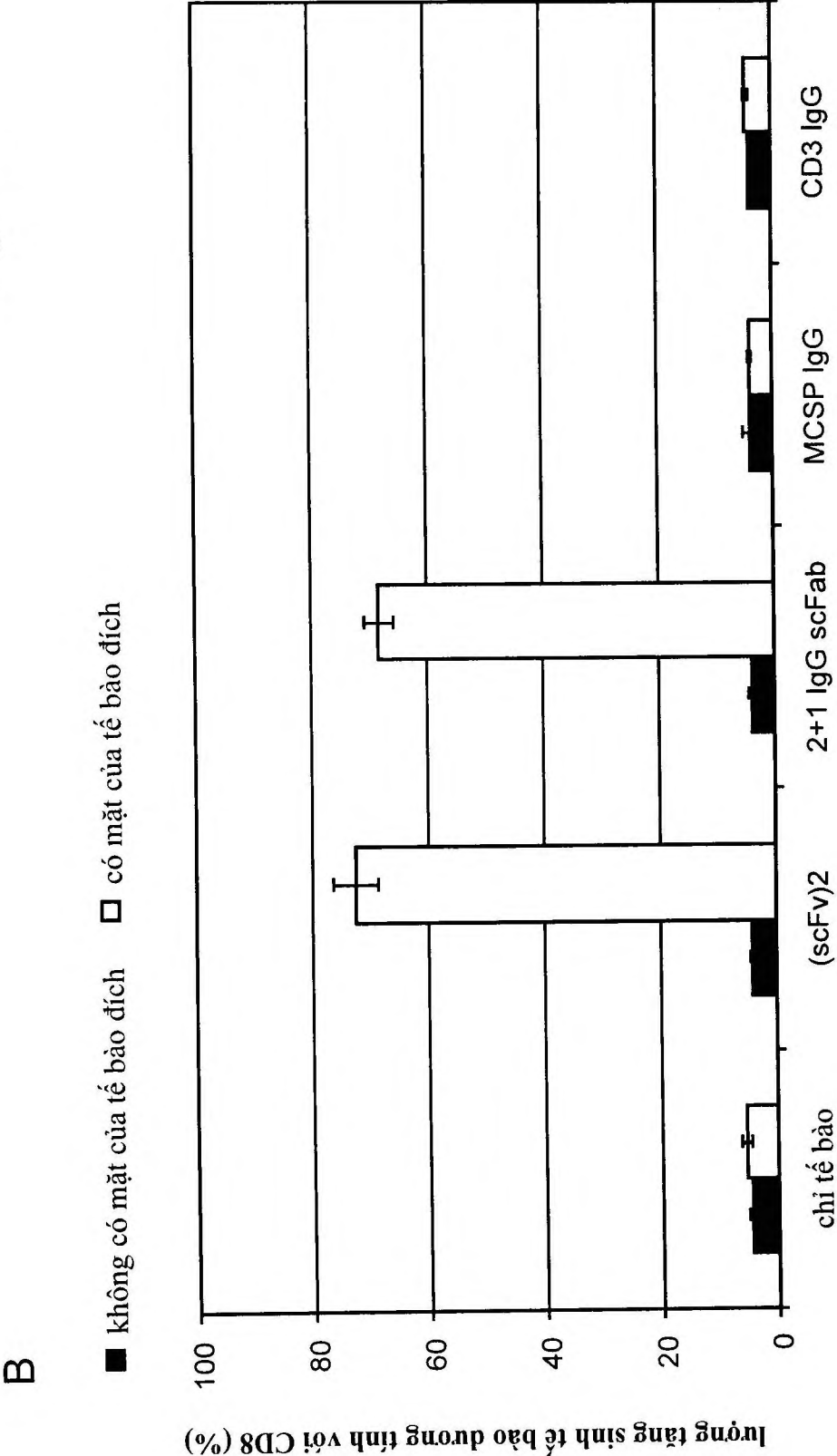


Fig. 45

A

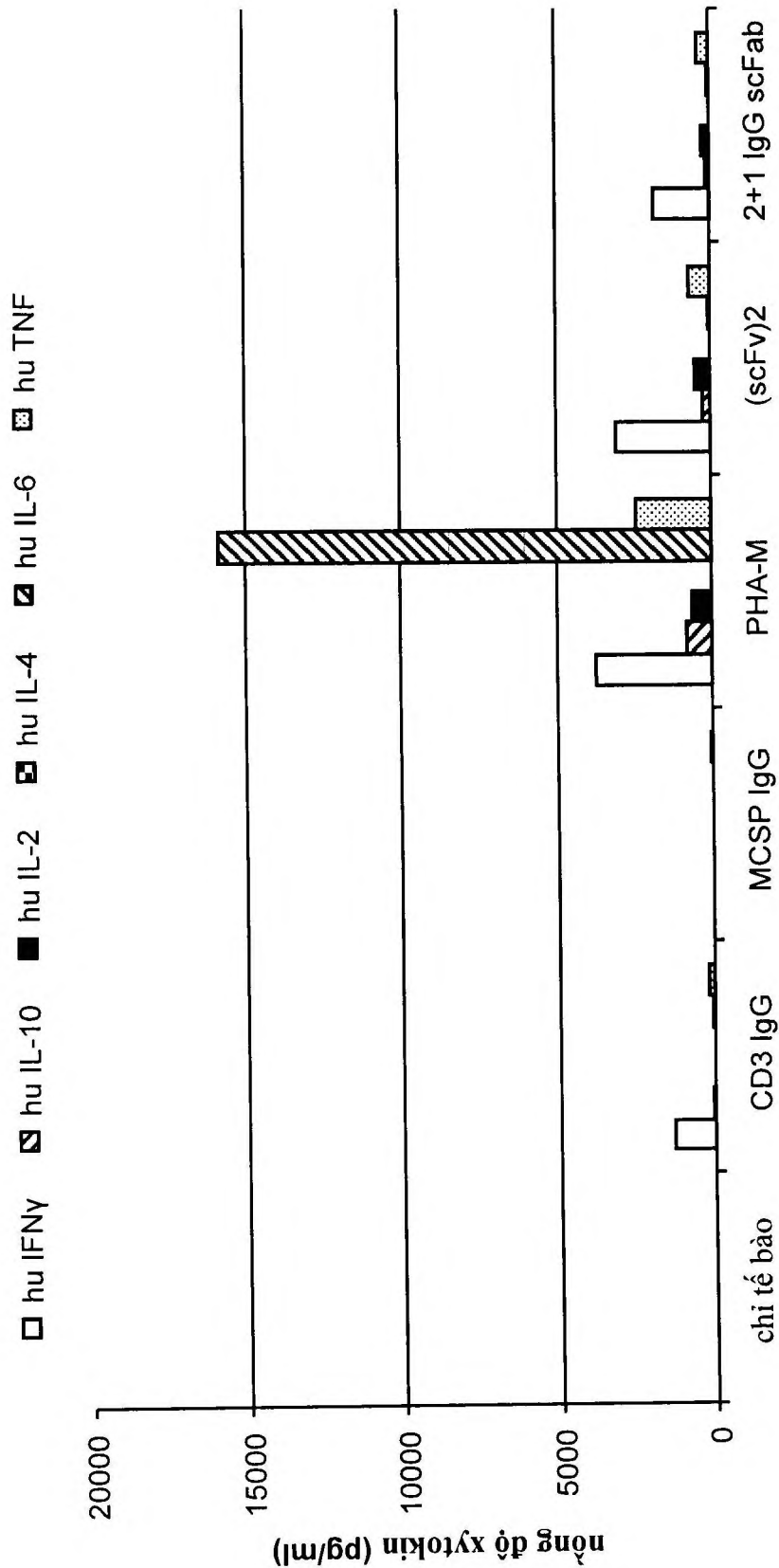
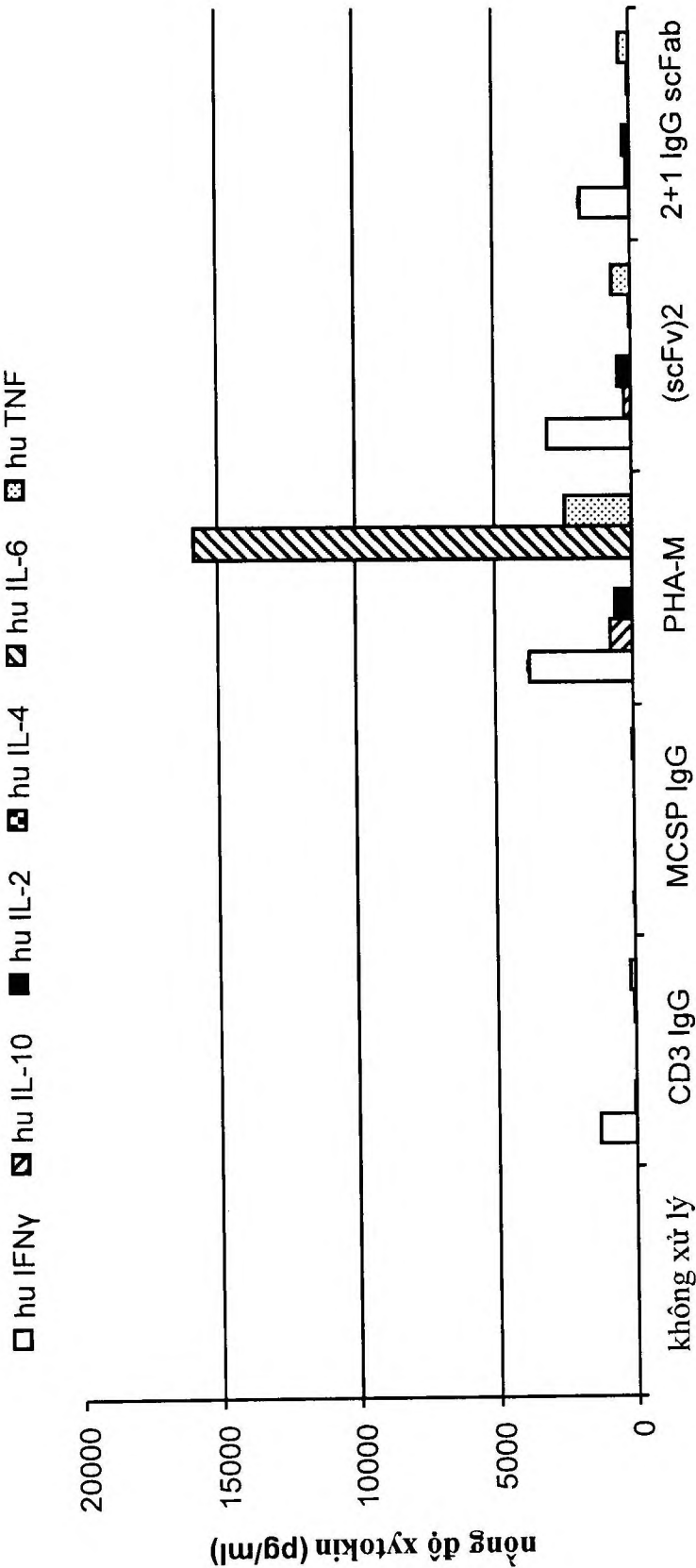


Fig. 46

B



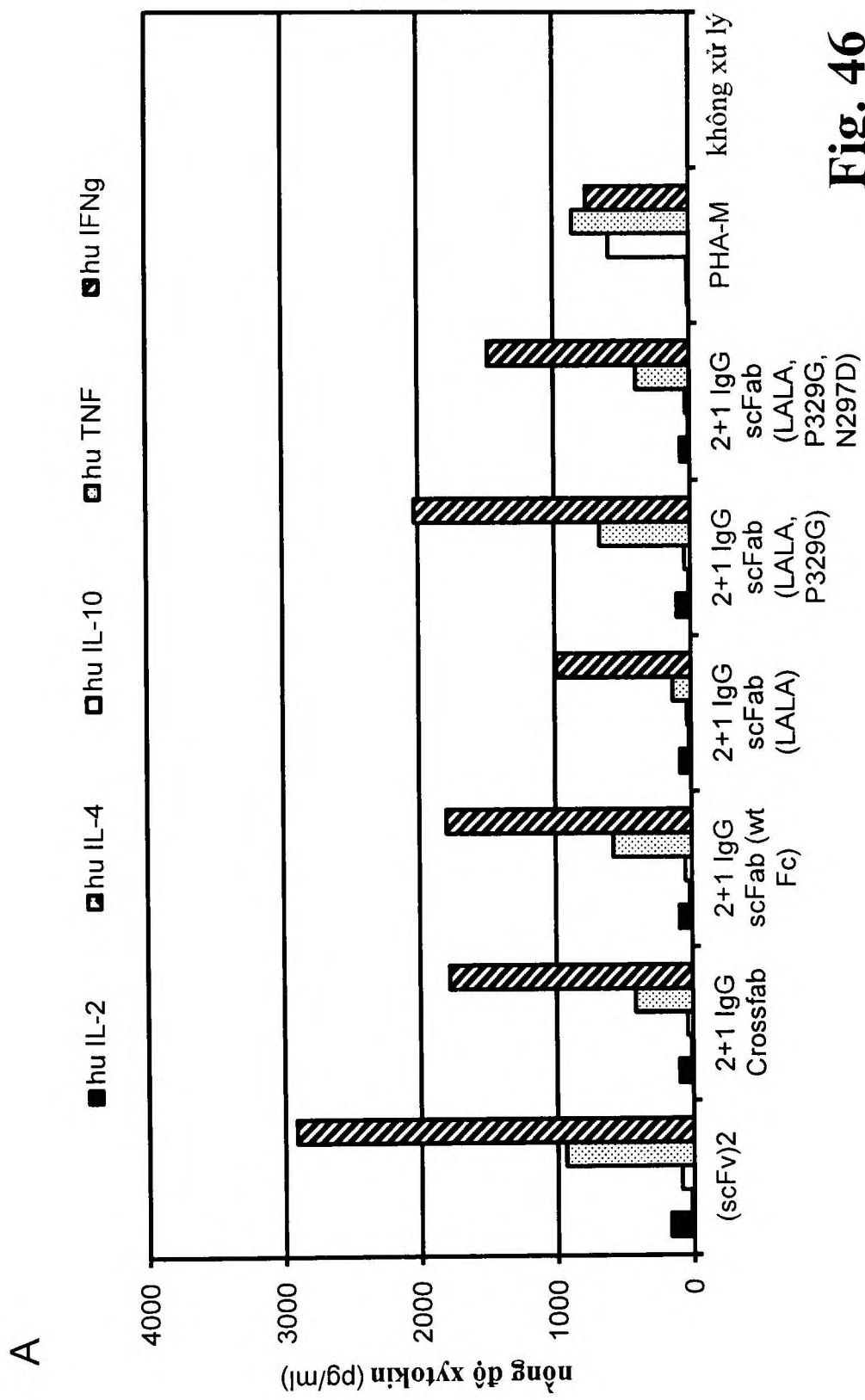


Fig. 46

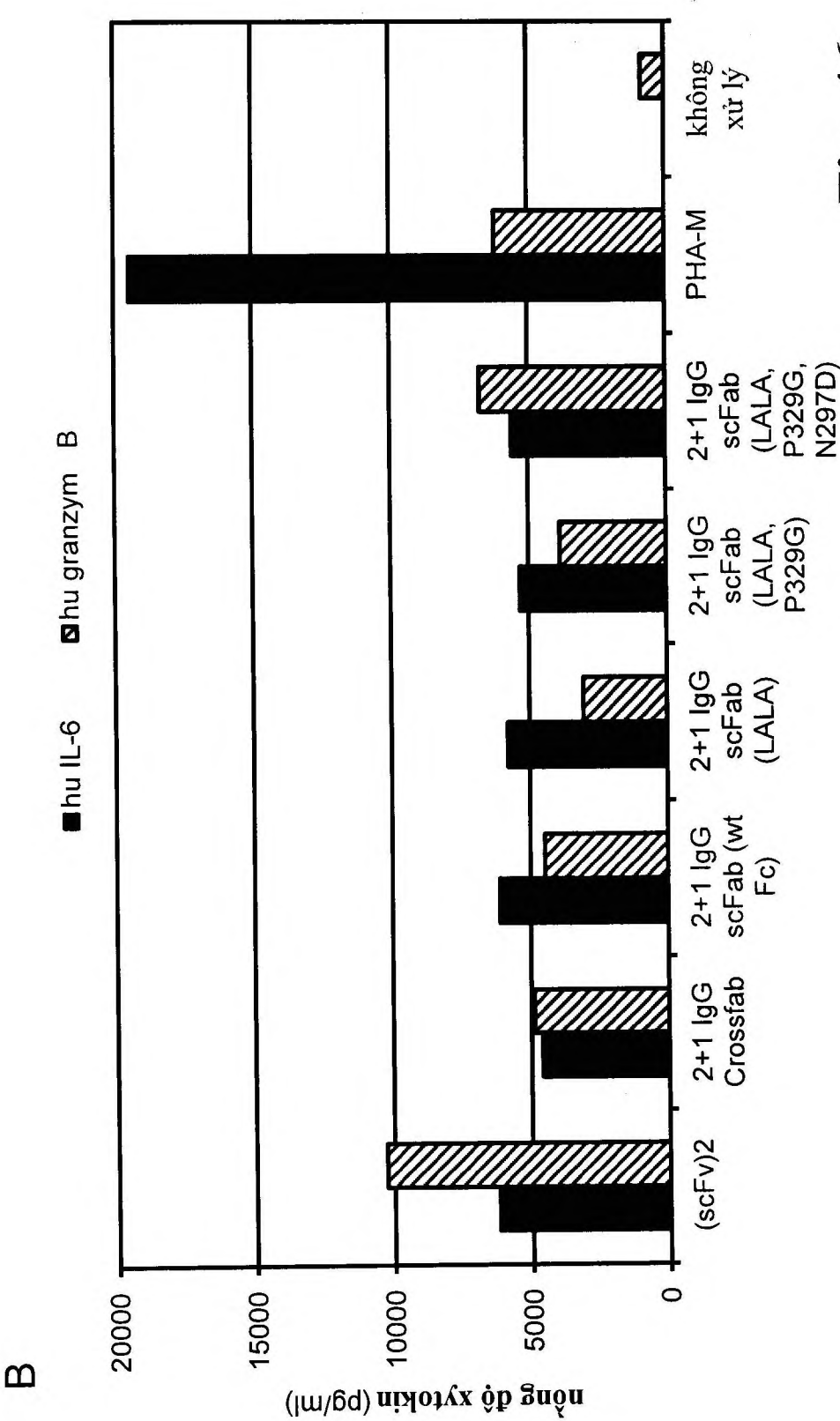
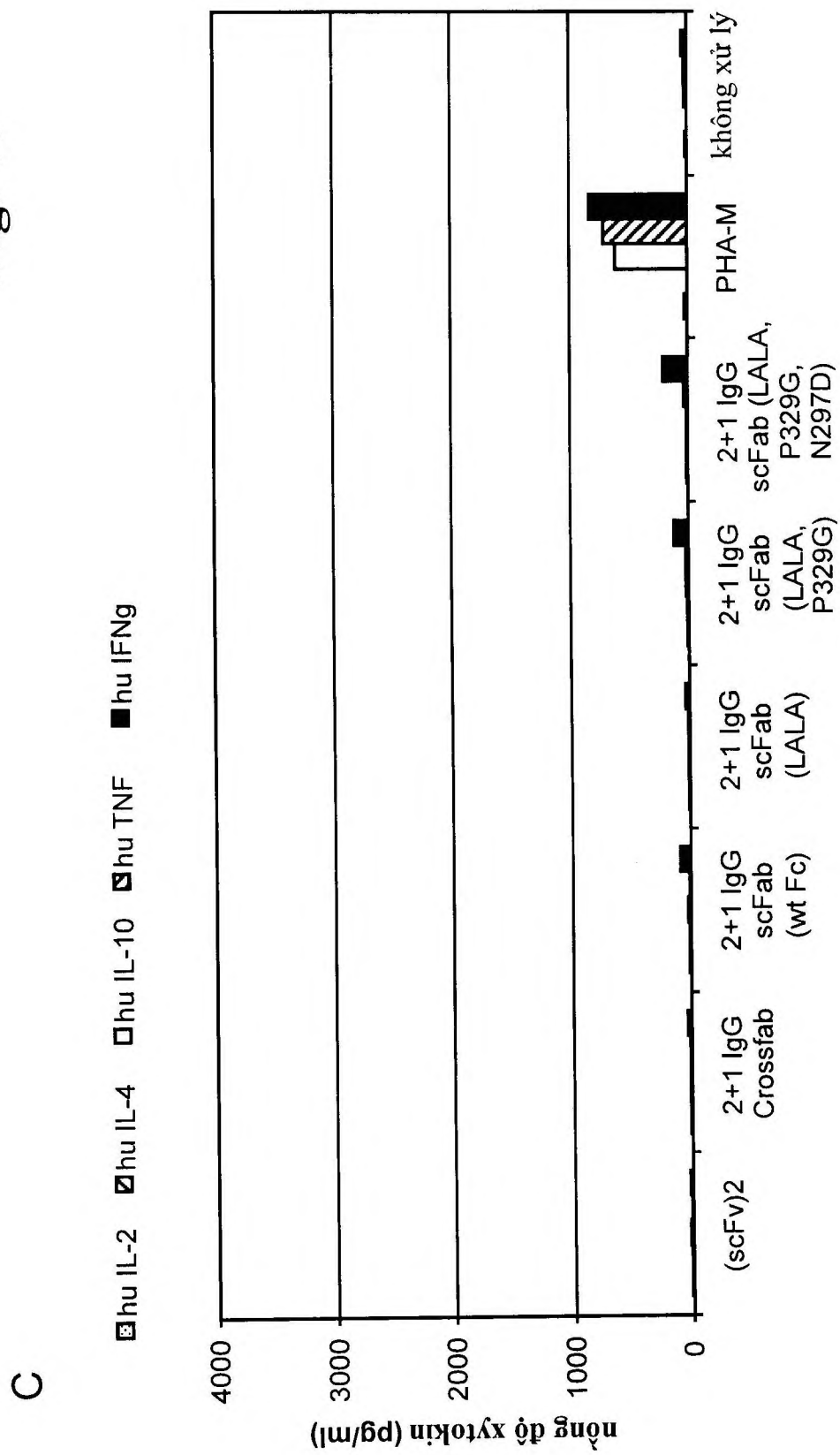
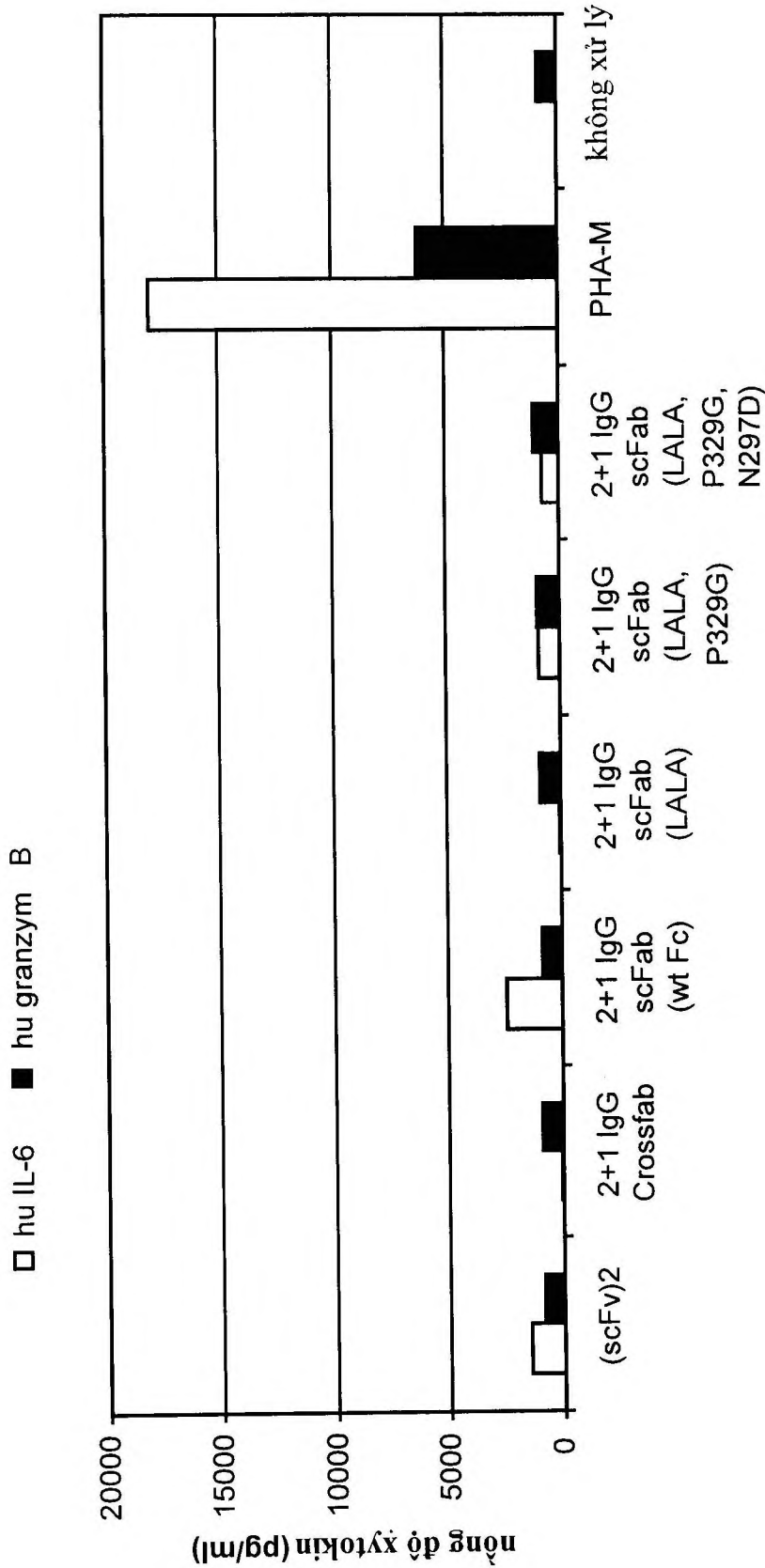


Fig. 46

Fig. 46



D **Fig. 46**



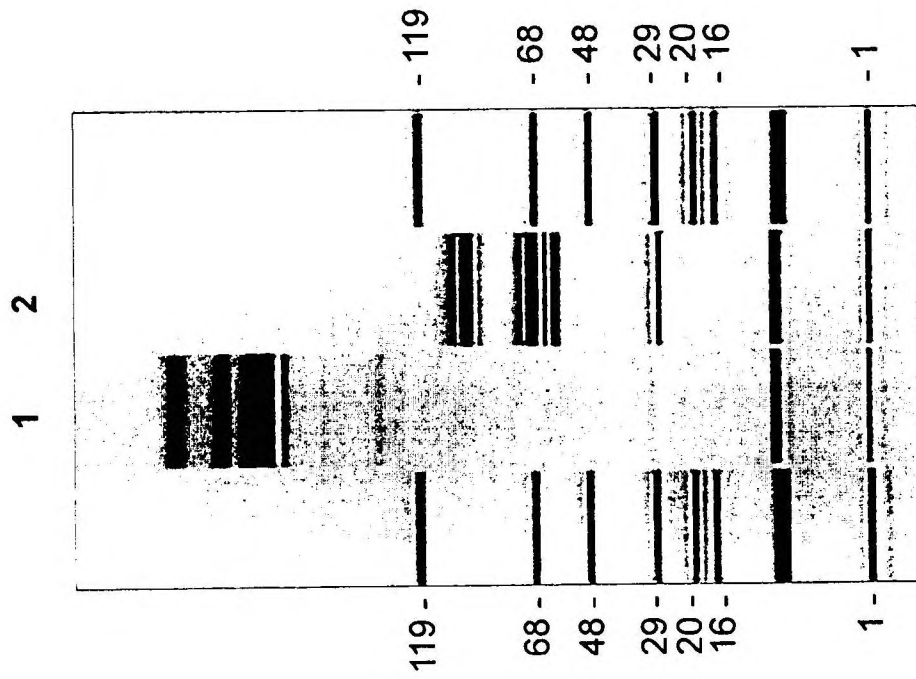
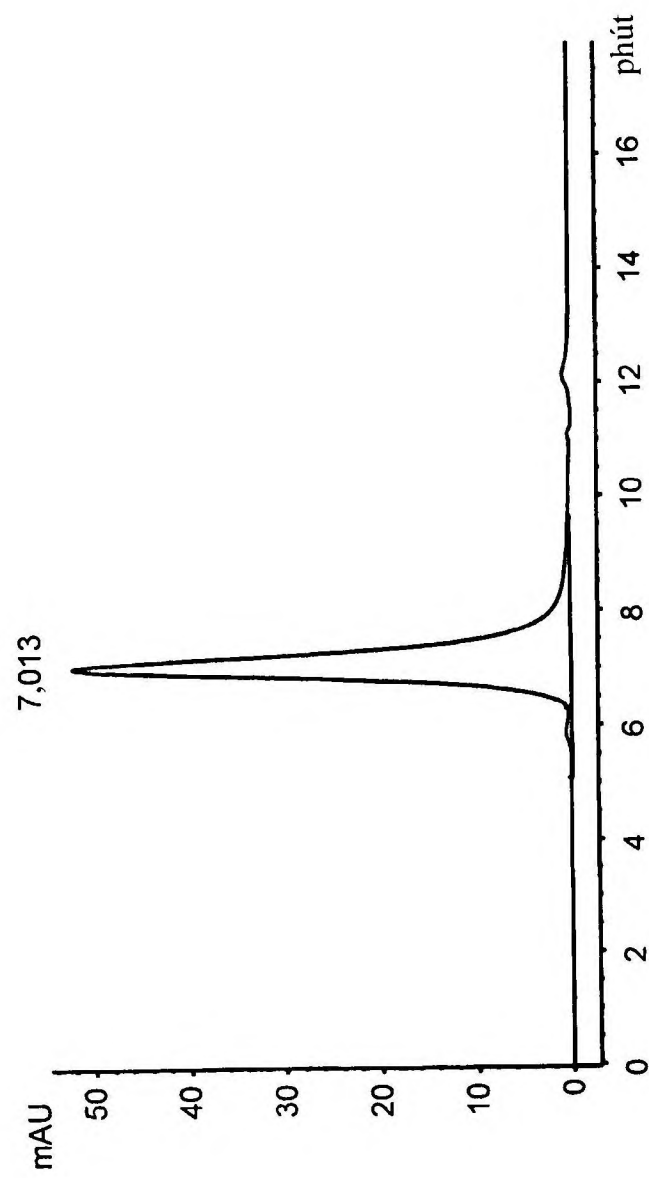


Fig. 47

Fig. 48



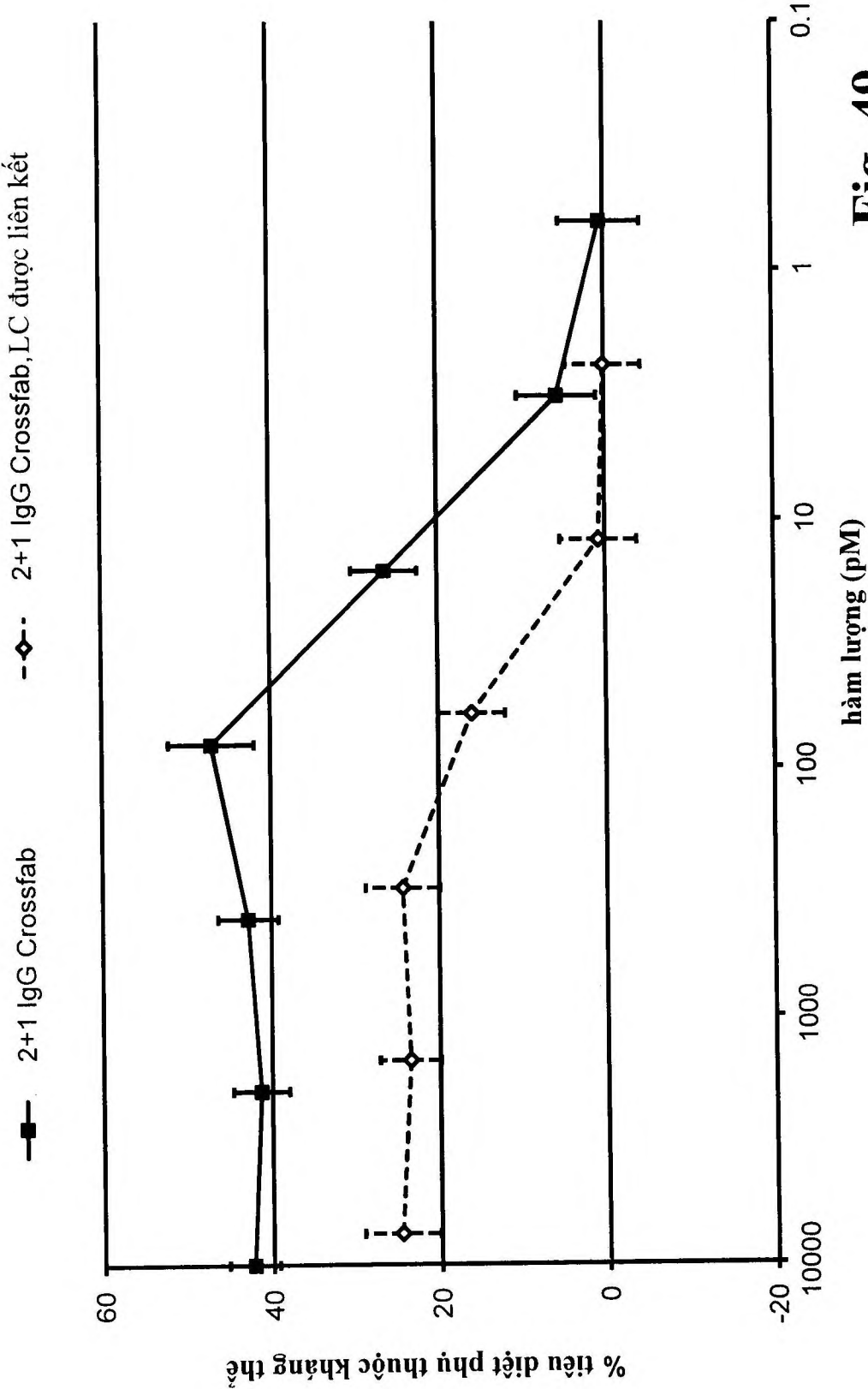


Fig. 49

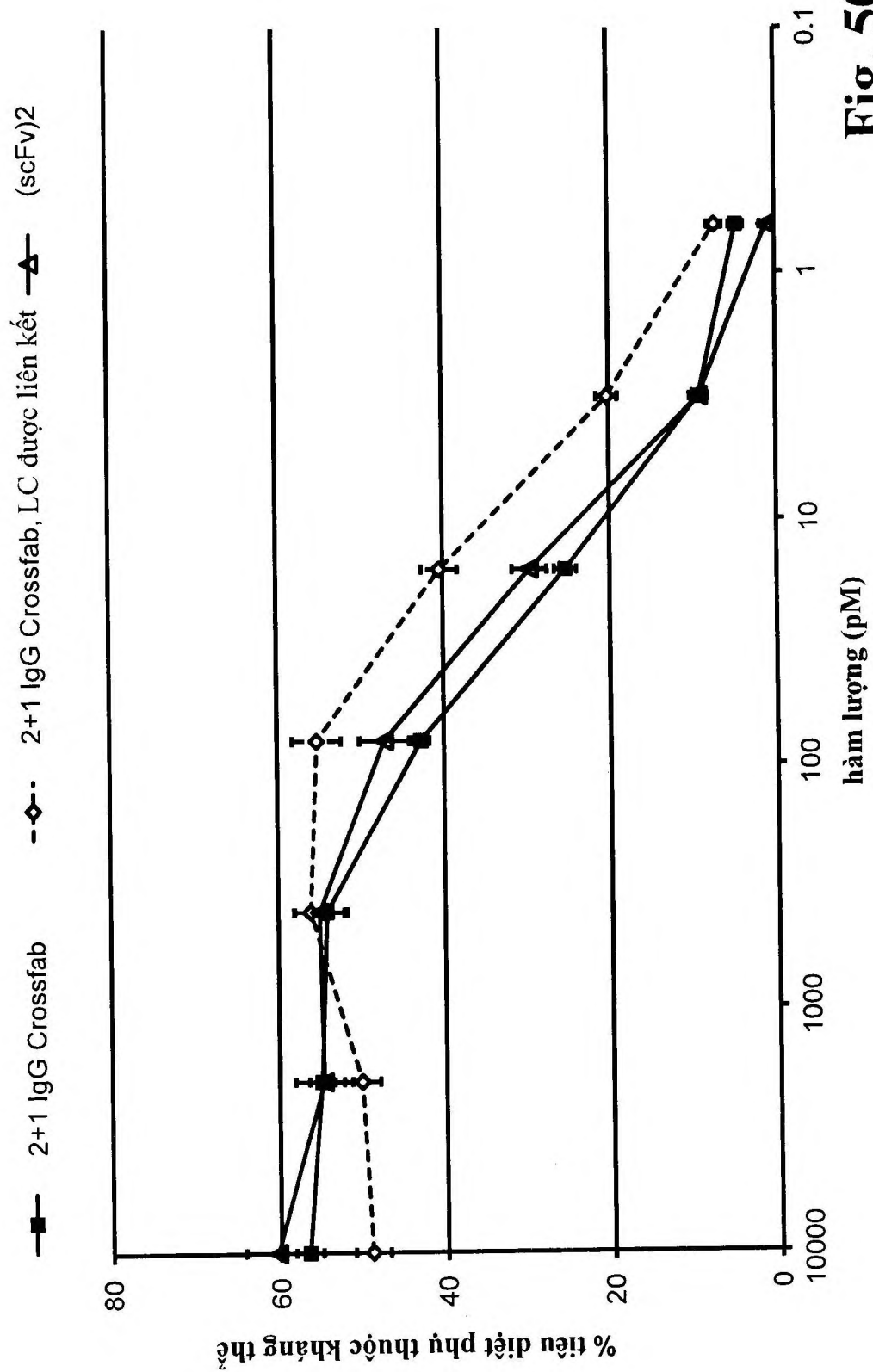


Fig. 50

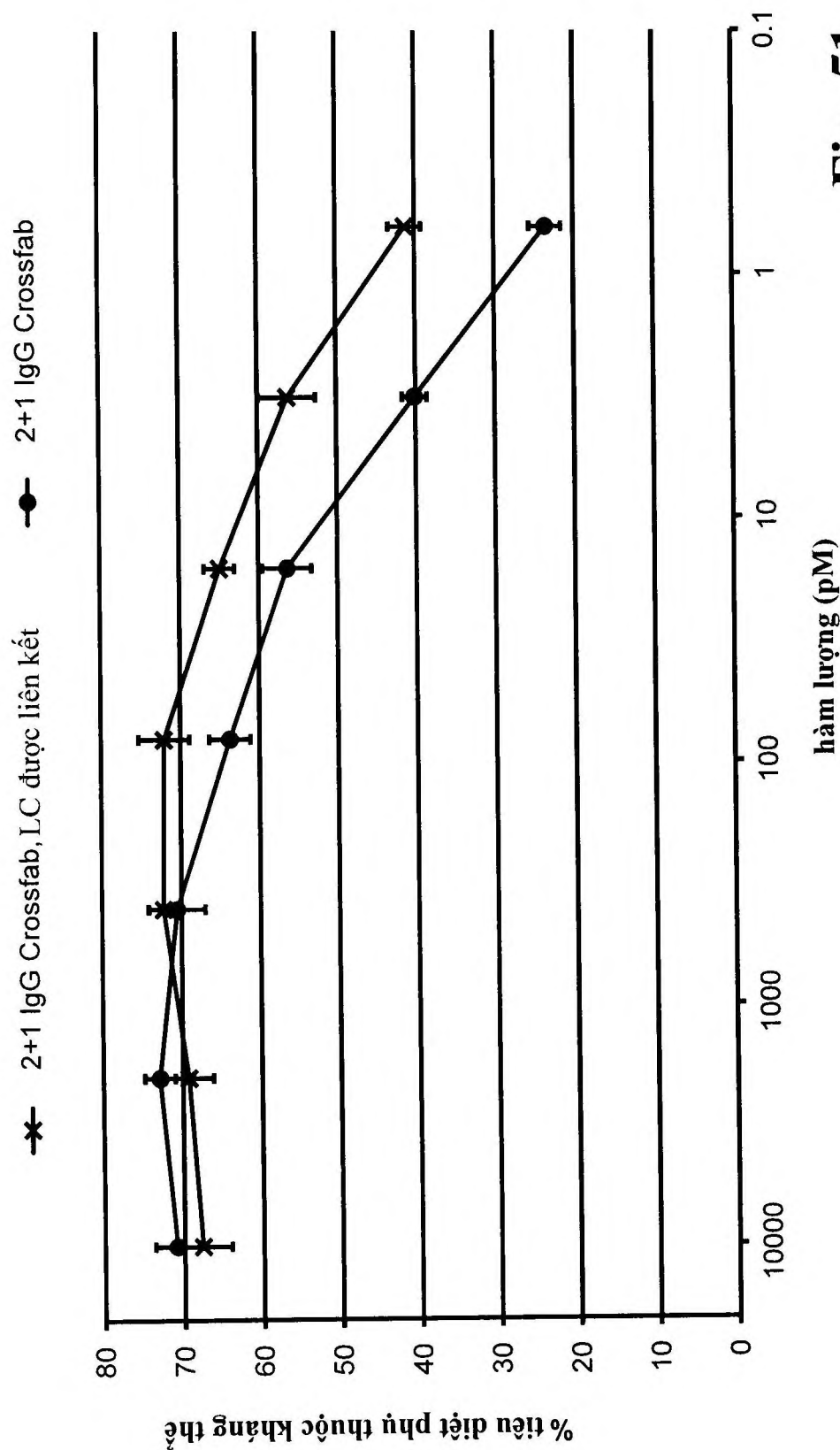


Fig. 51

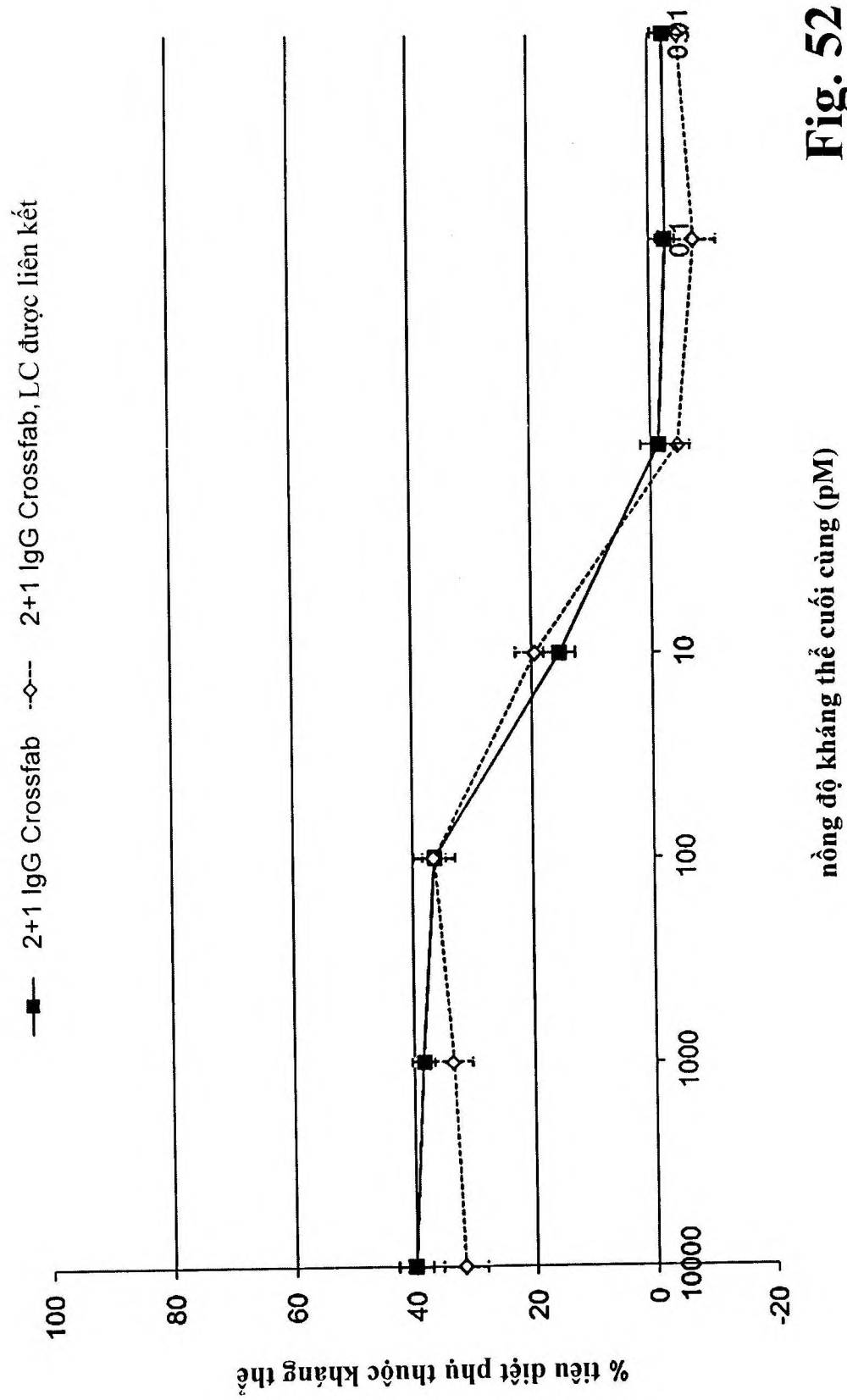


Fig. 52

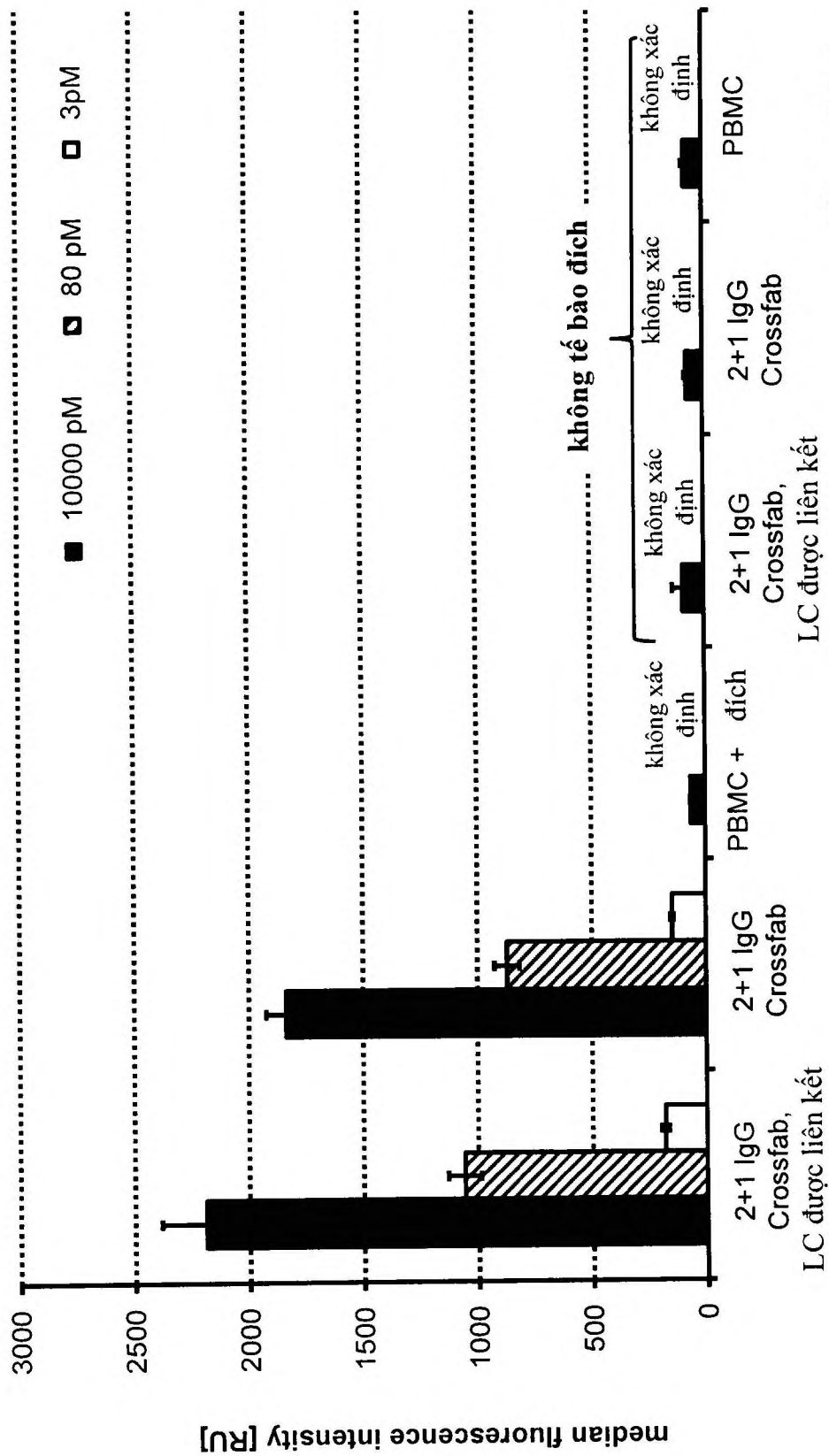


Fig. 53A

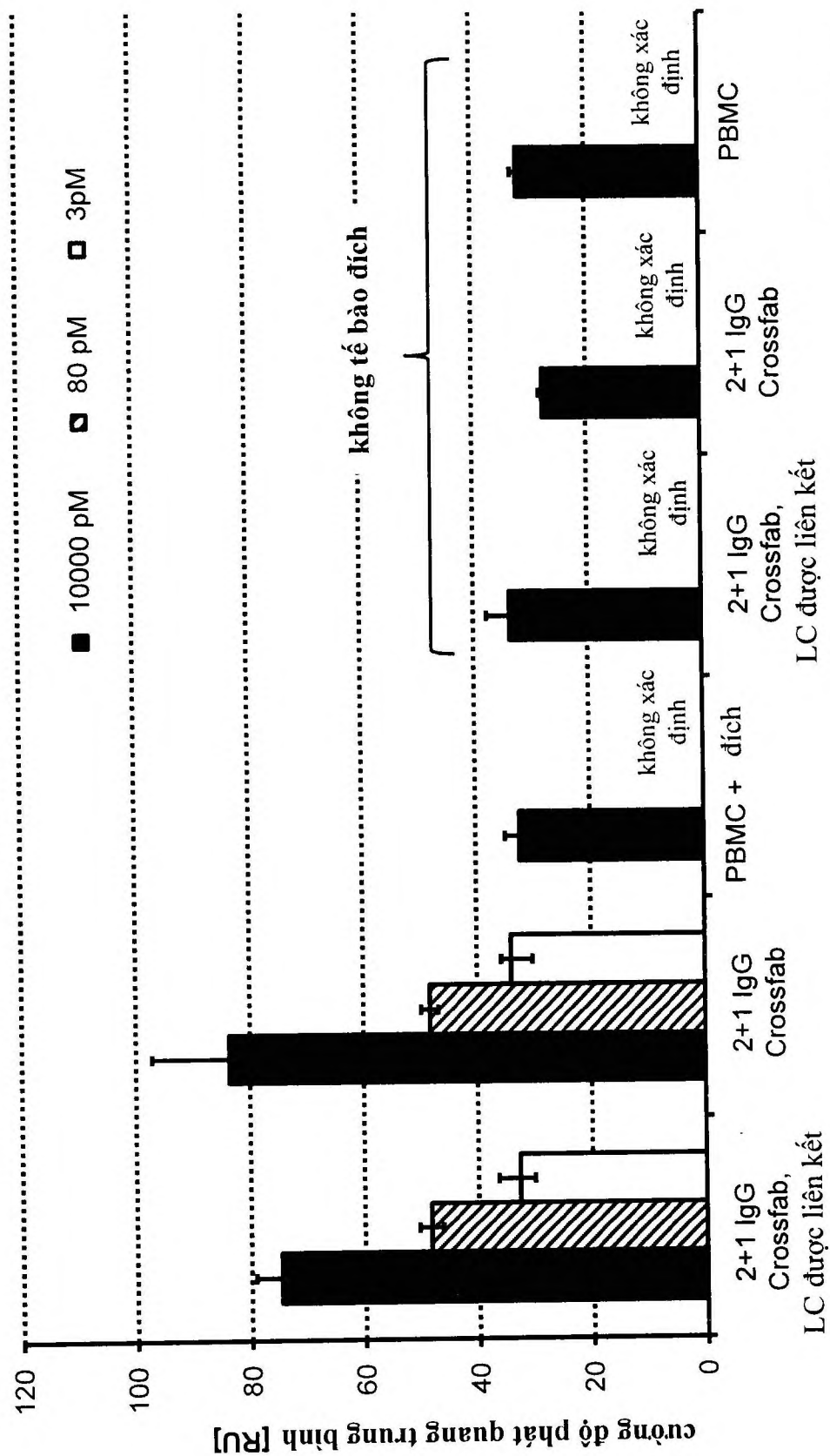


Fig. 53B

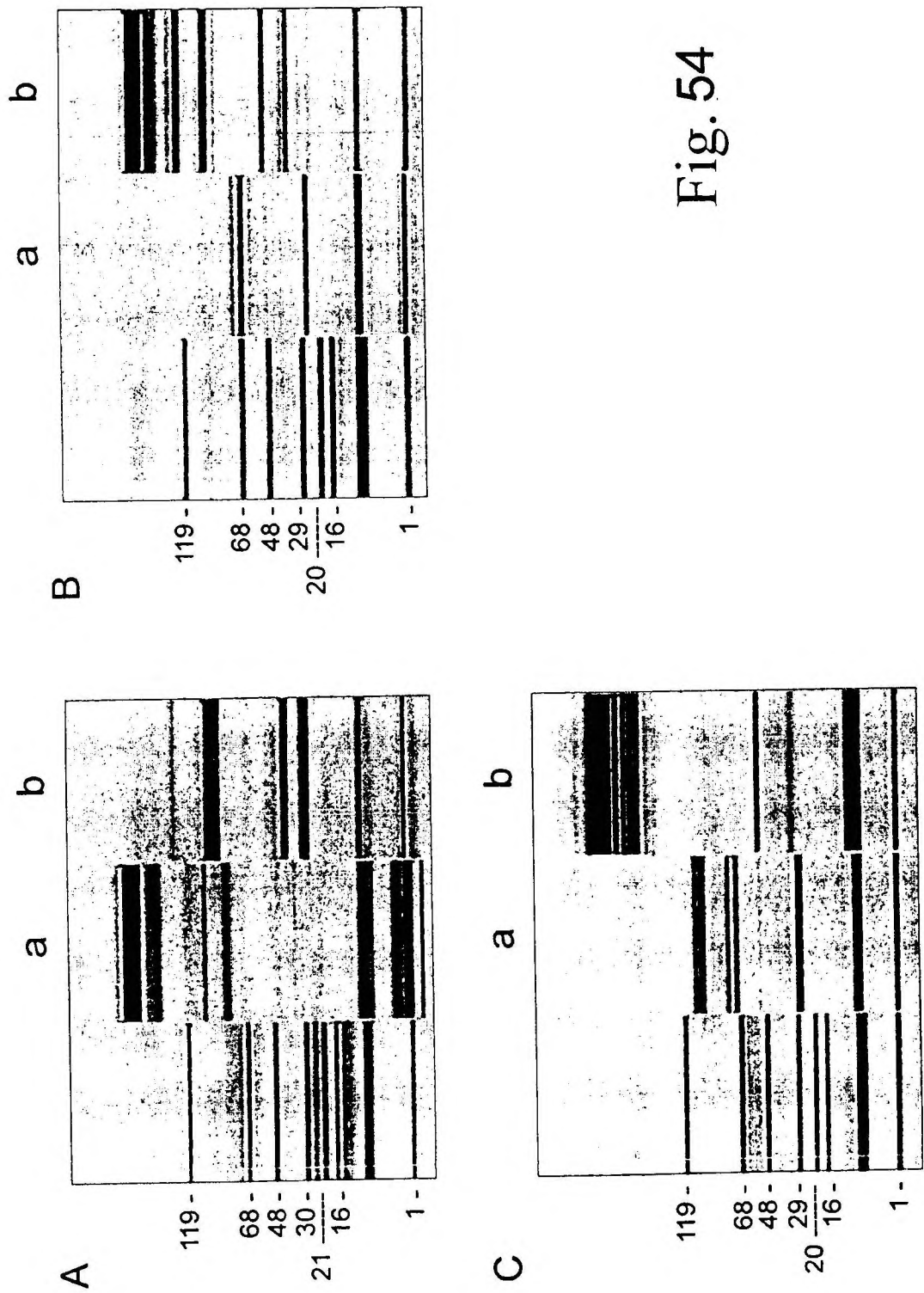


Fig. 54

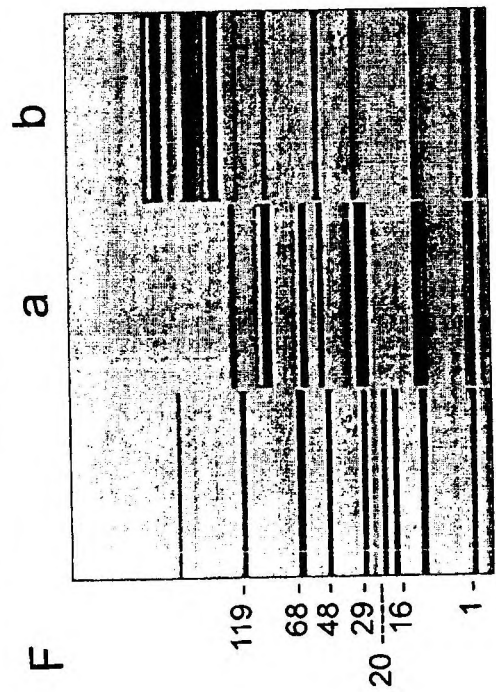
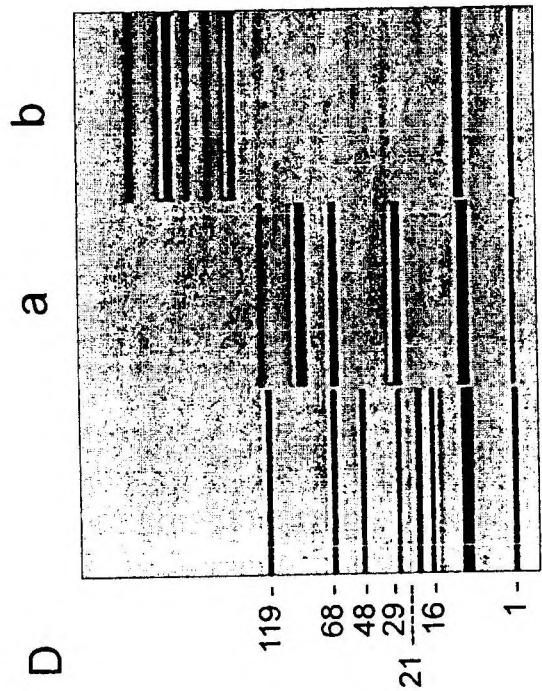
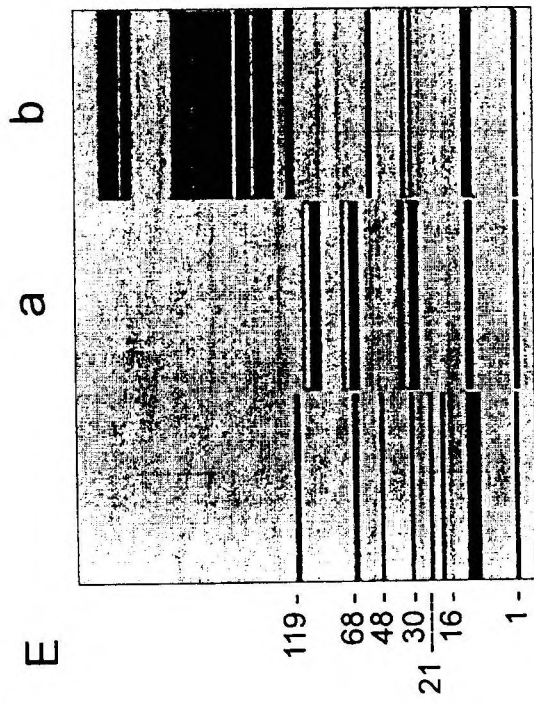


Fig. 54

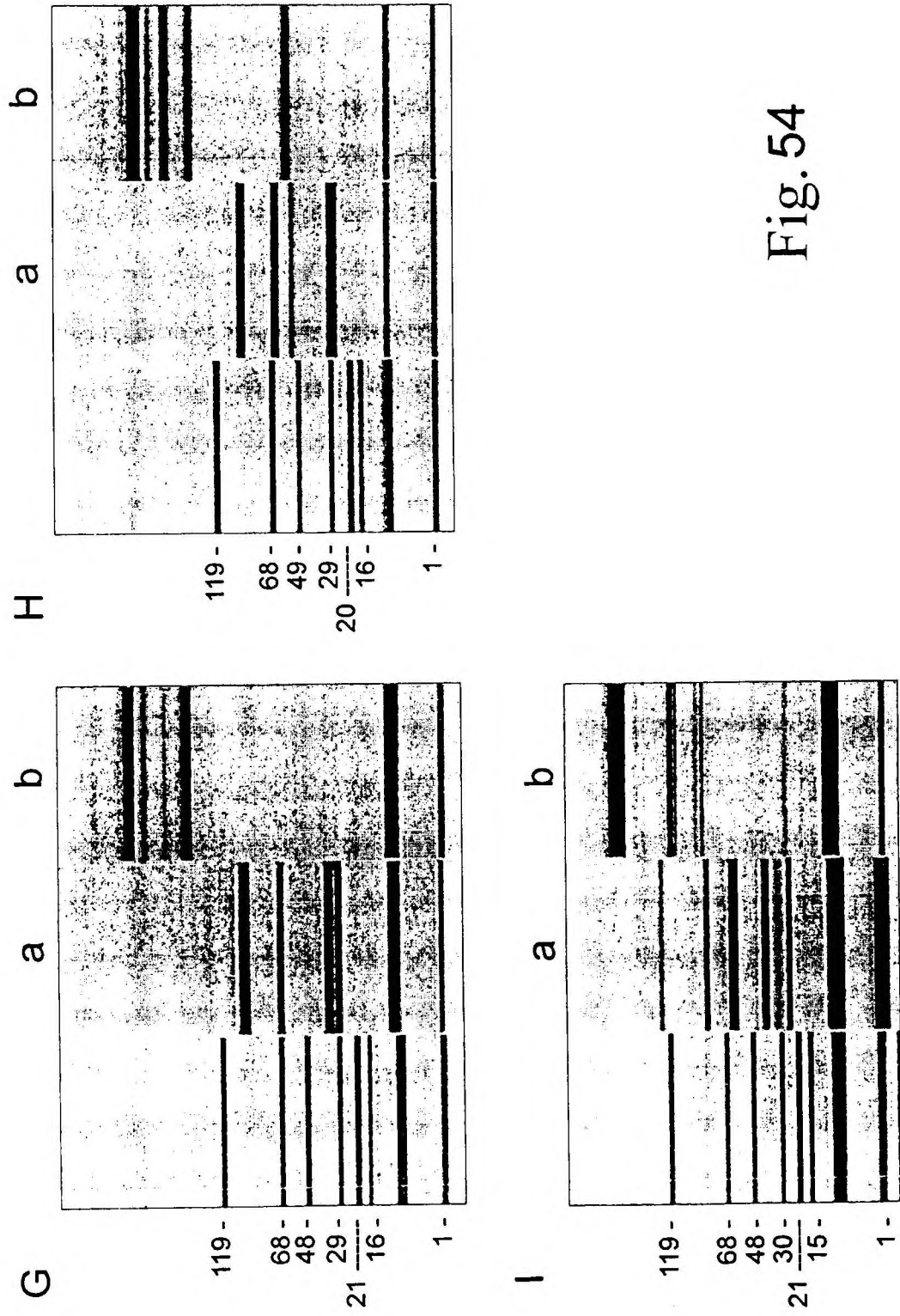


Fig. 54

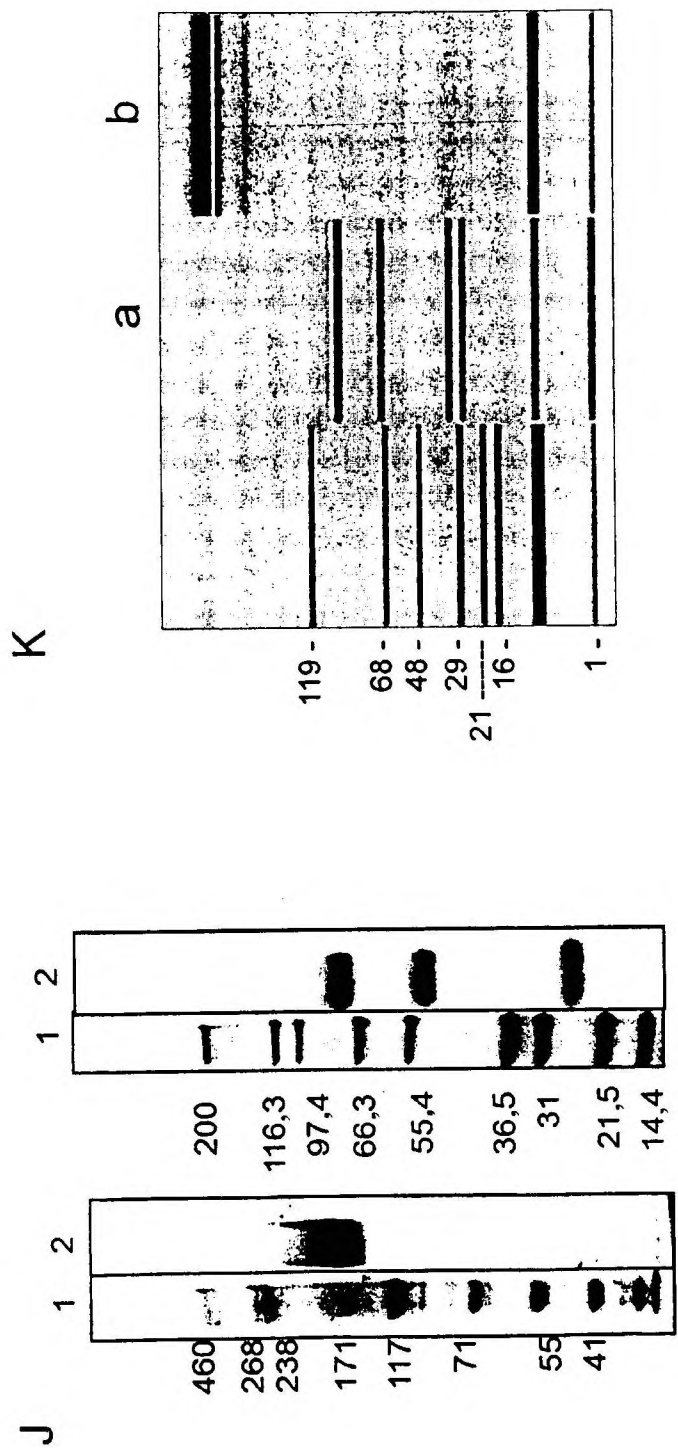
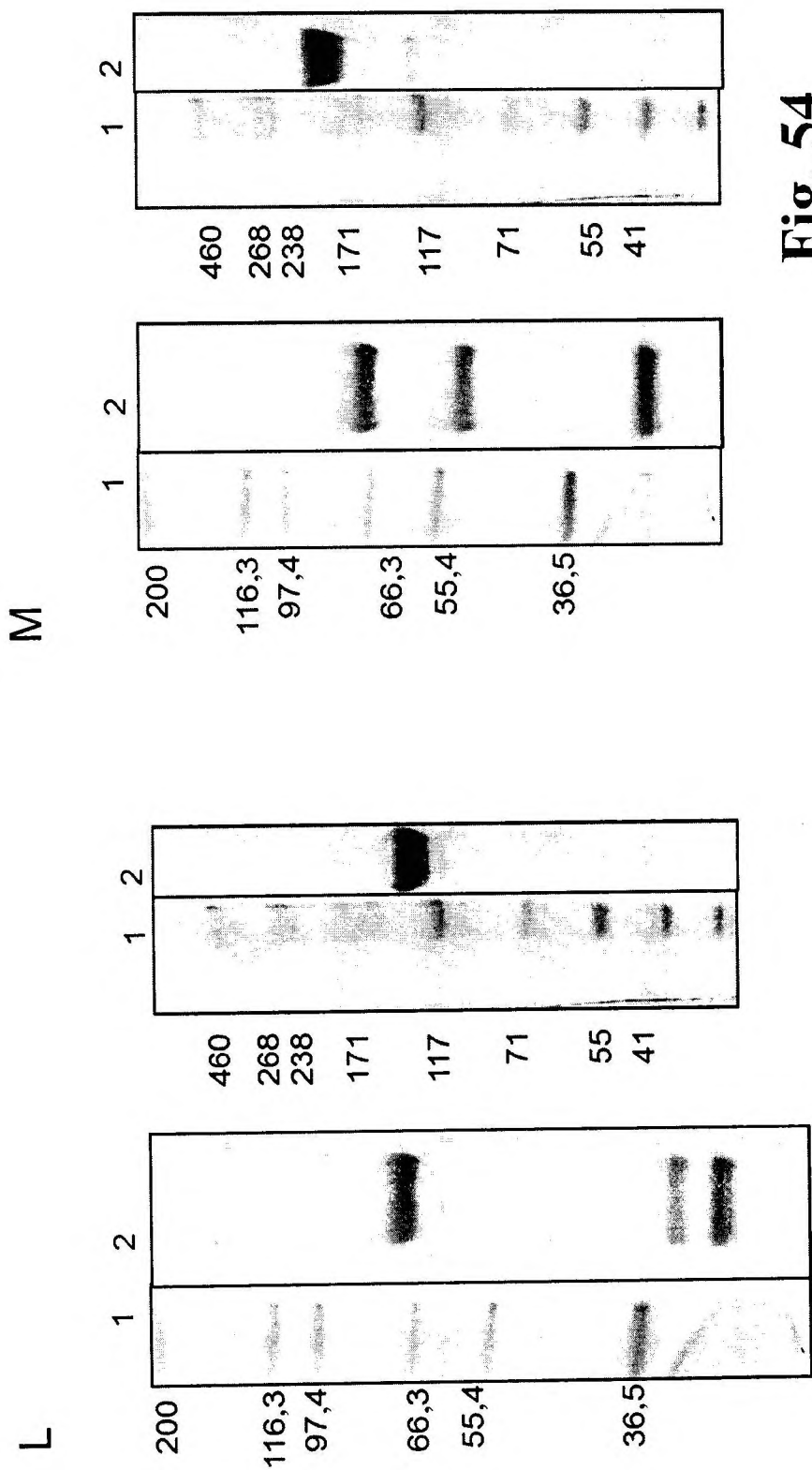


Fig. 54



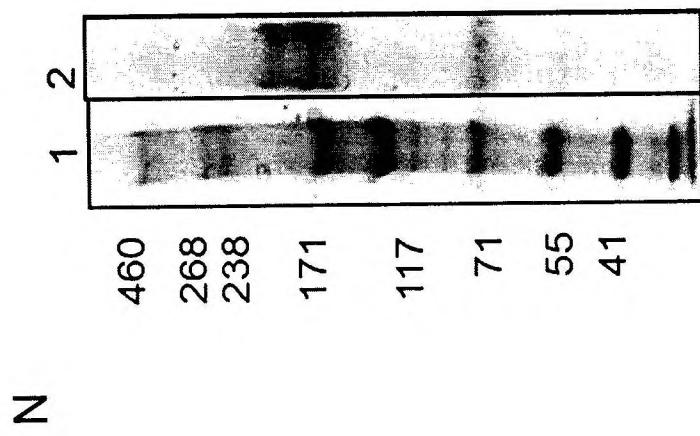


Fig. 54

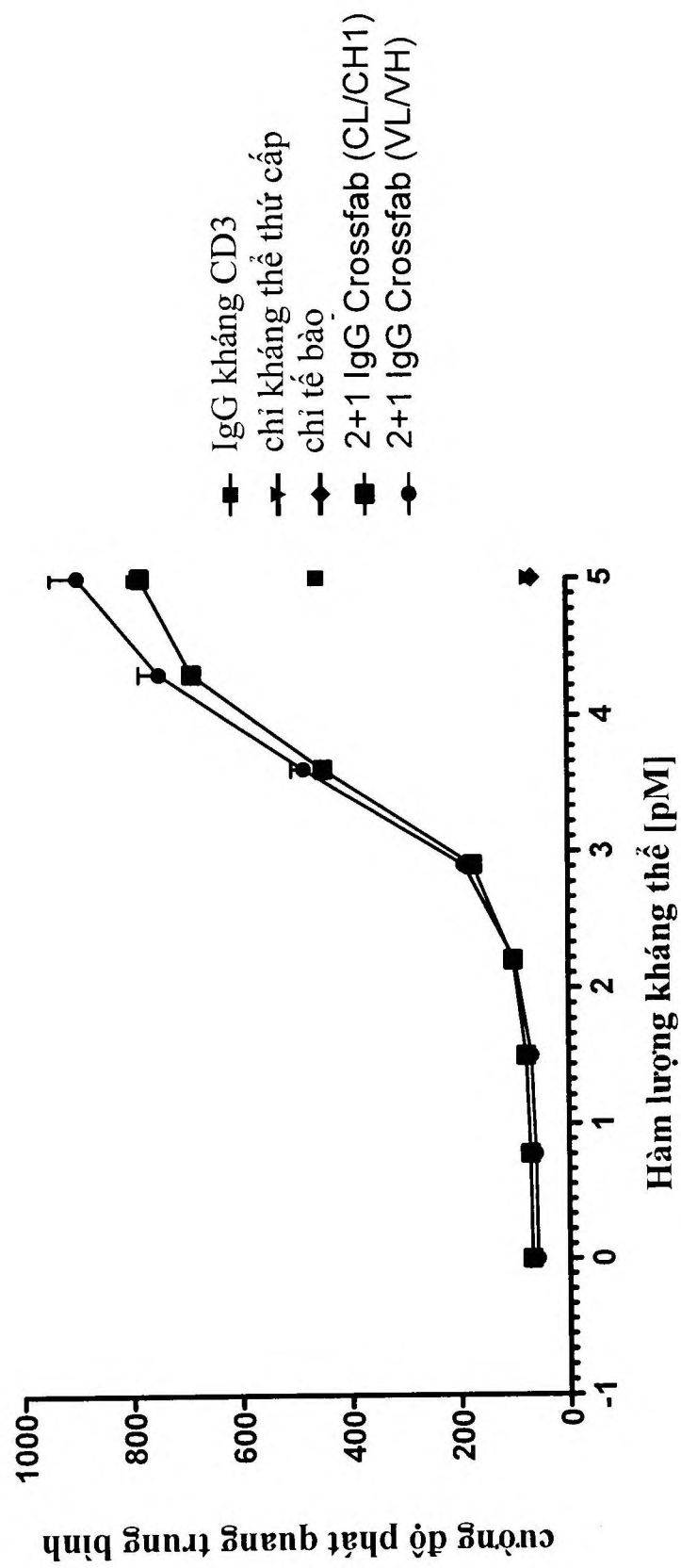


Fig. 55A

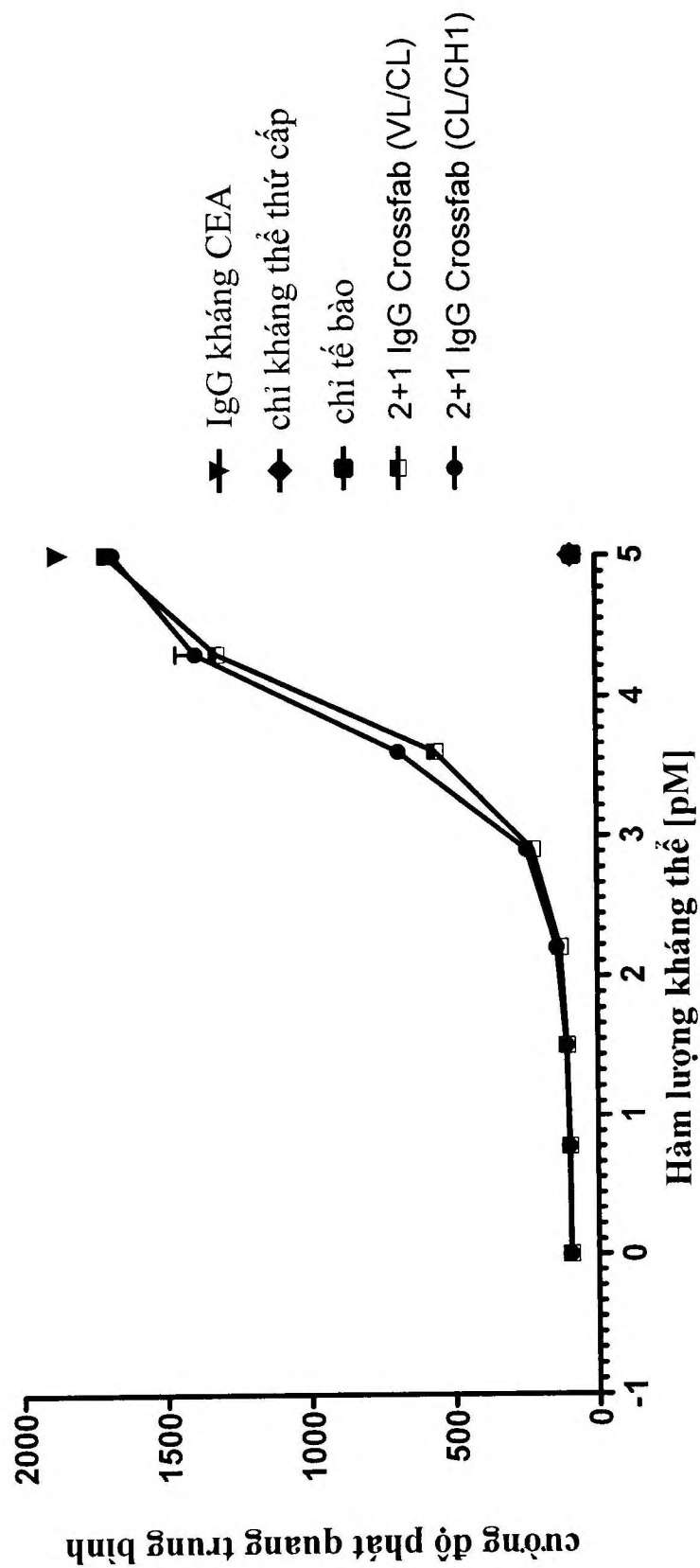


Fig. 55B

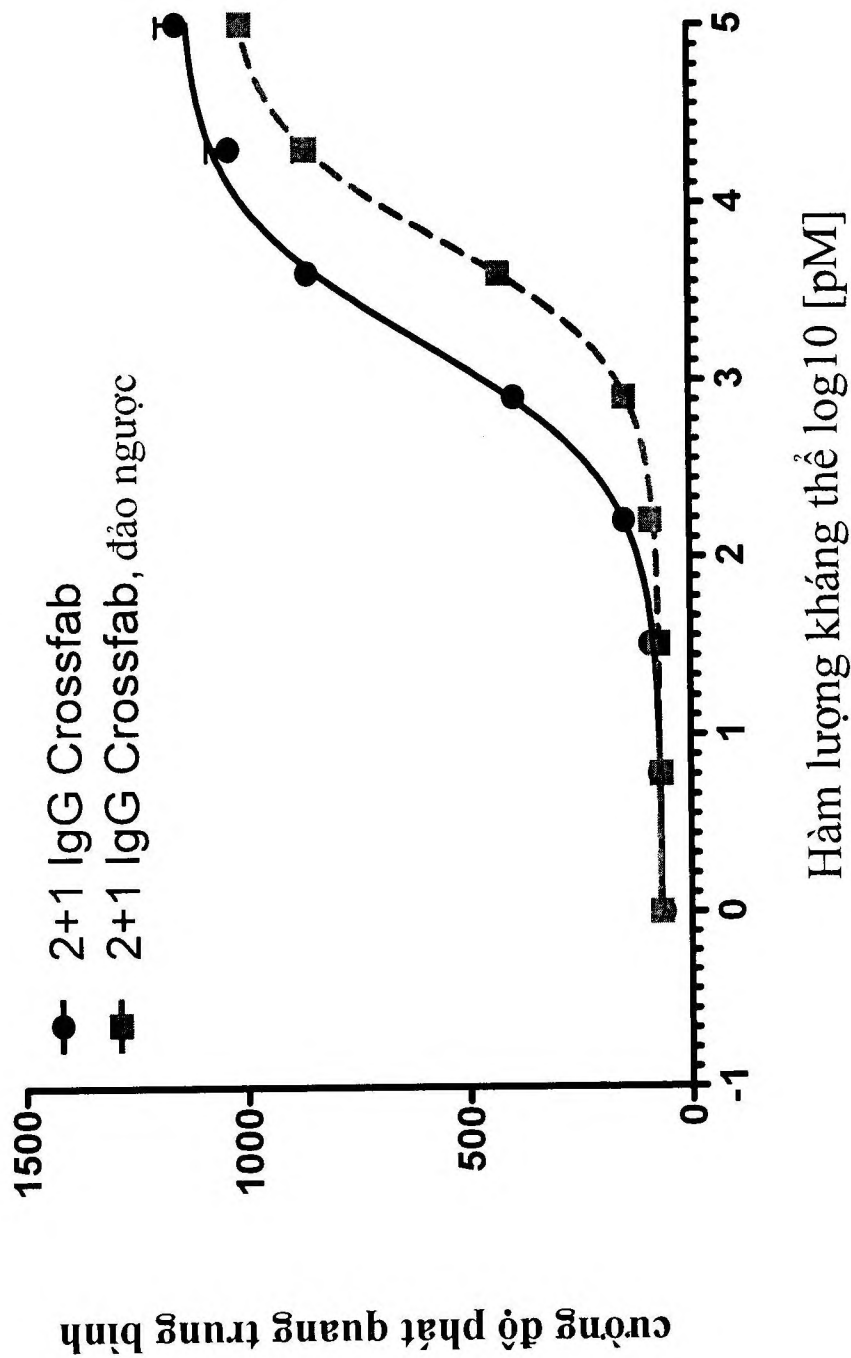


Fig. 56A

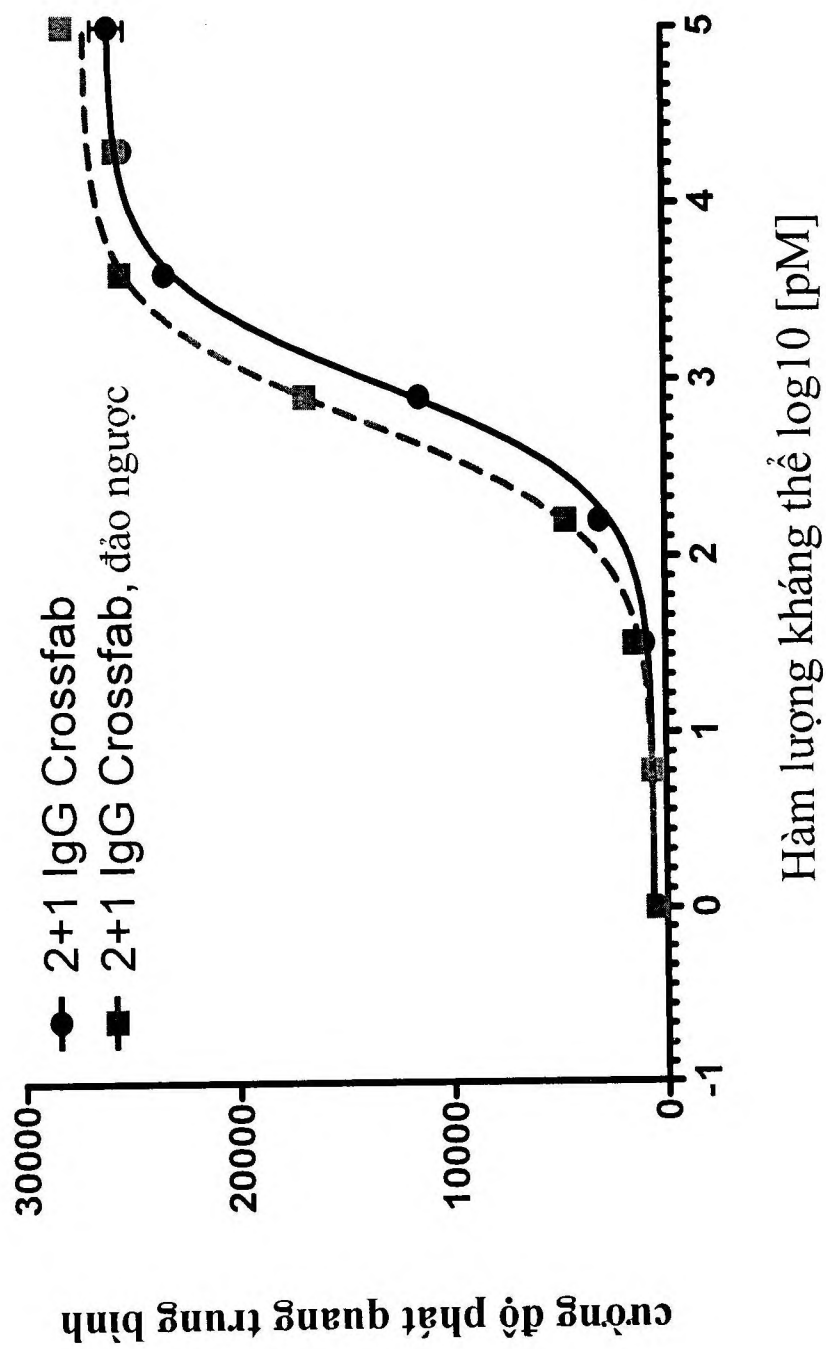


Fig. 56B

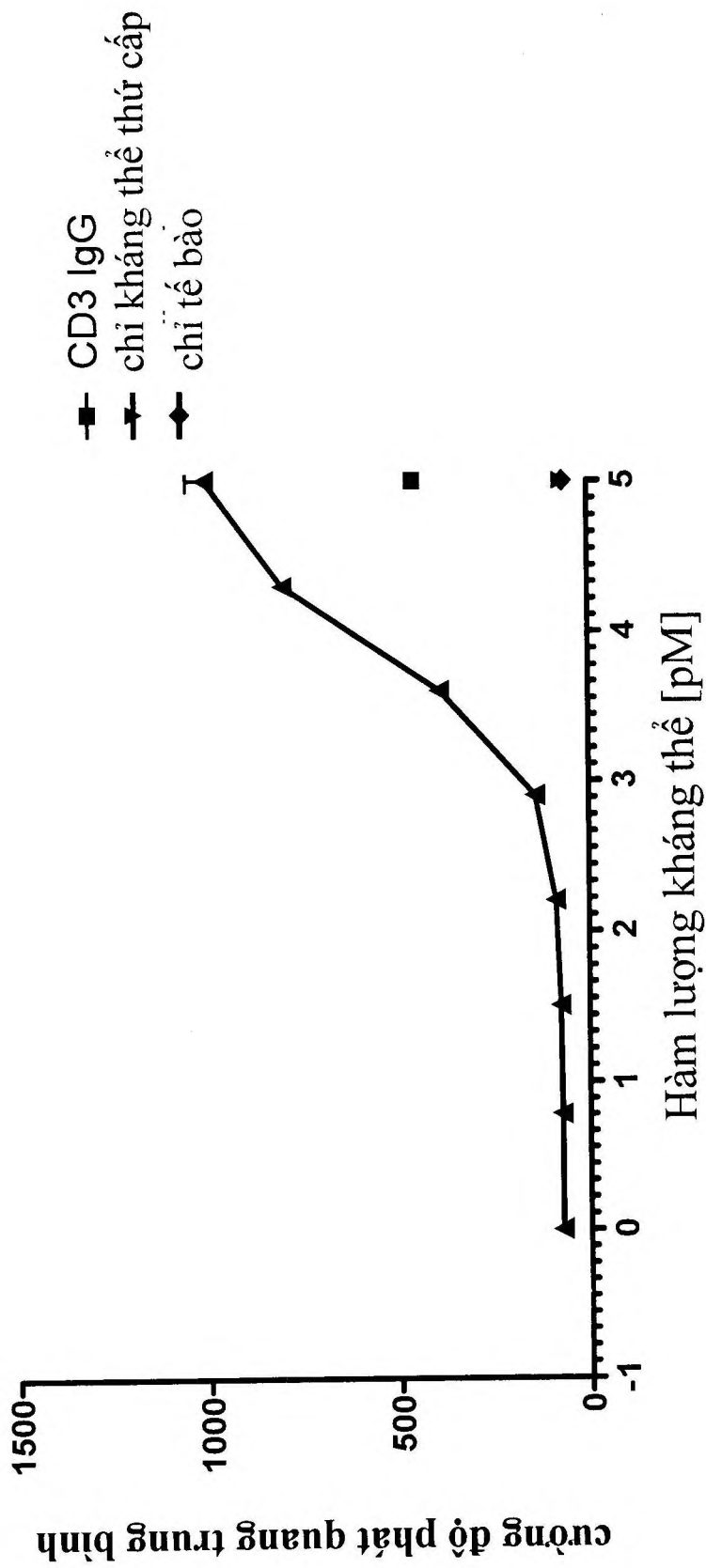


Fig. 57A

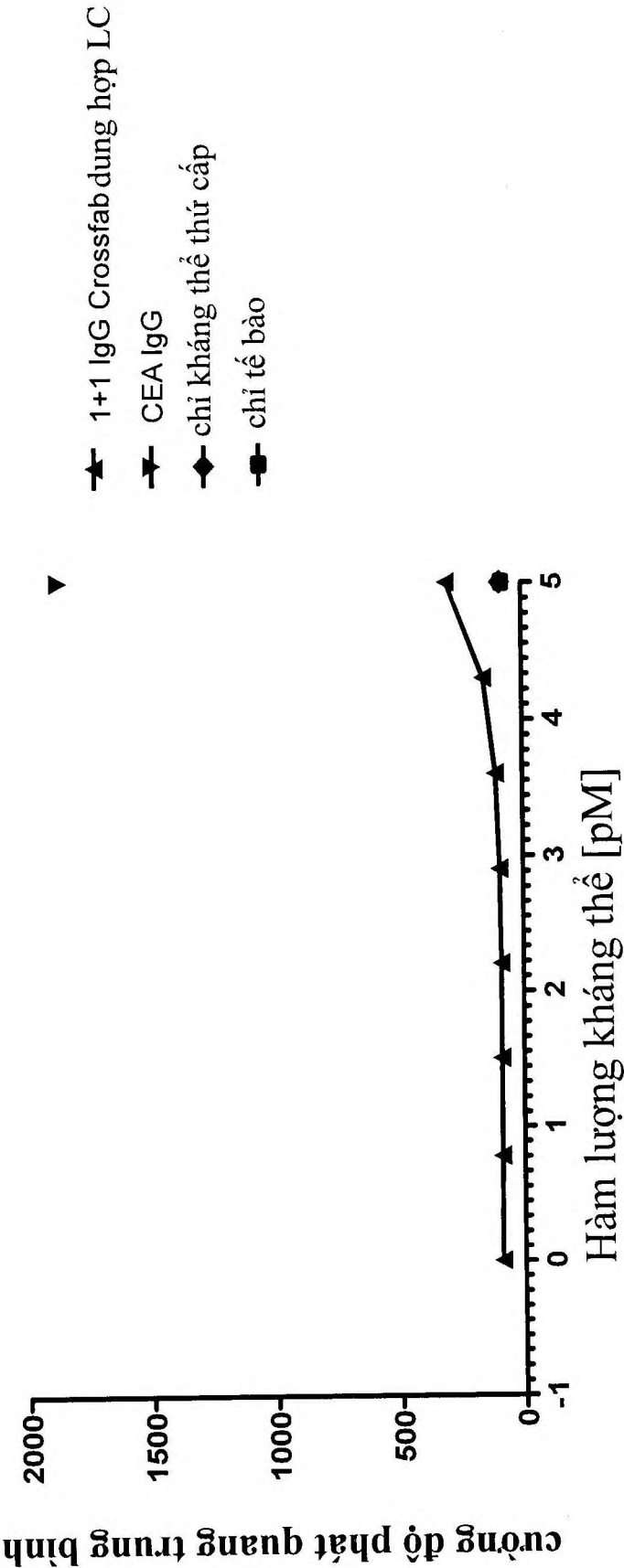


Fig. 57B

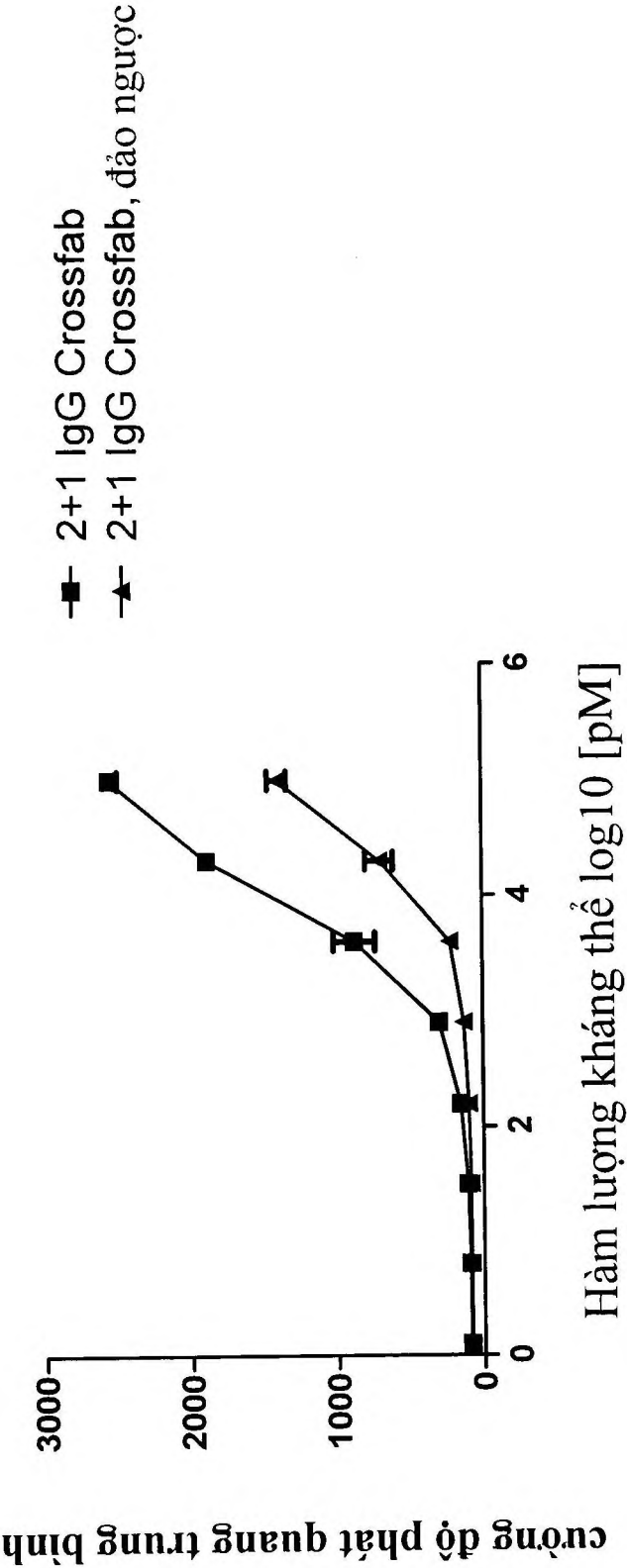


Fig. 58A

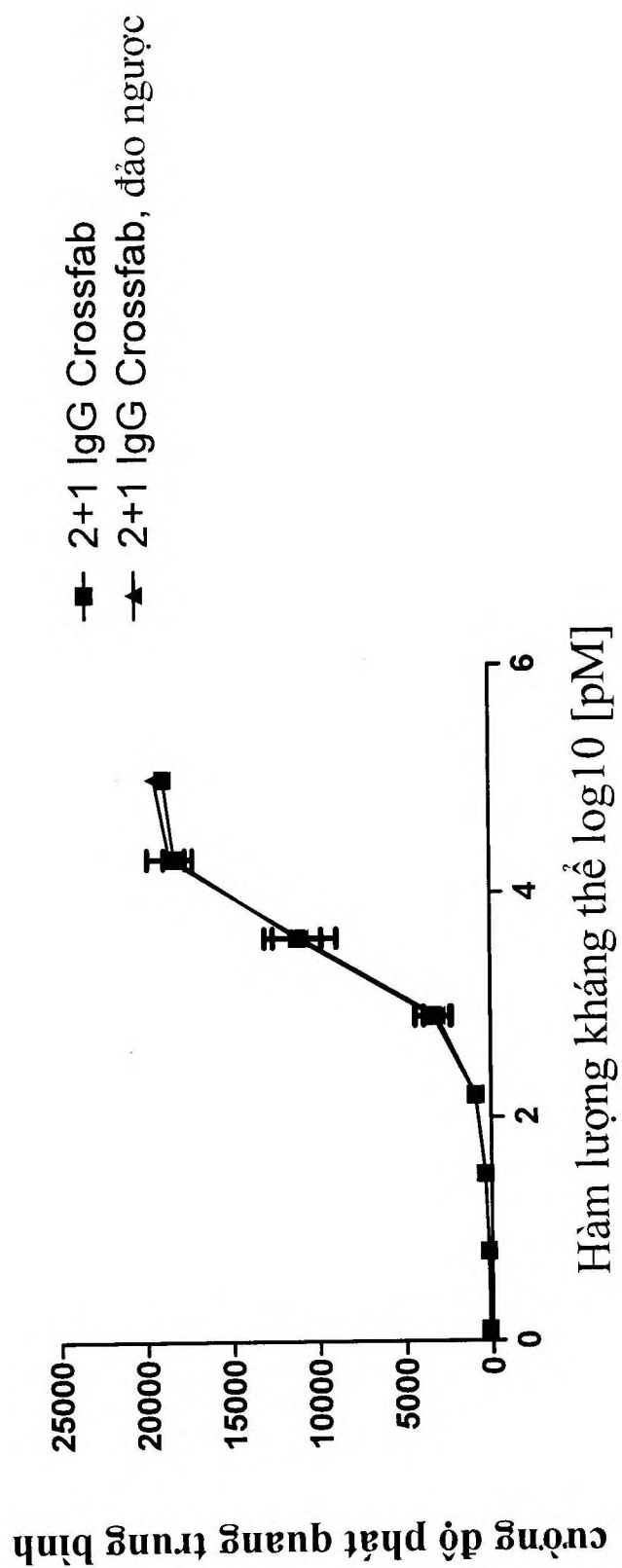


Fig. 58B

Fig. 60A

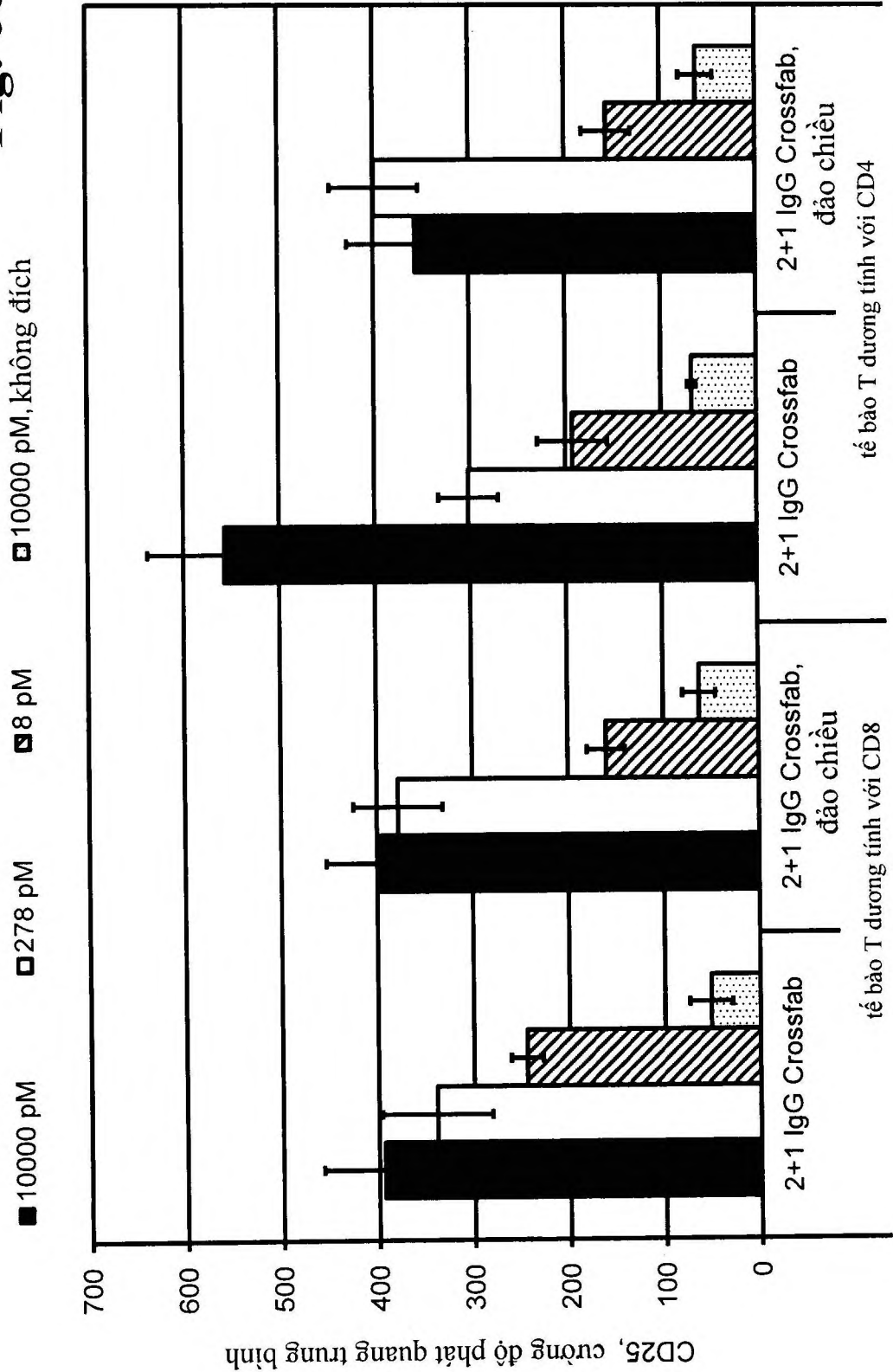
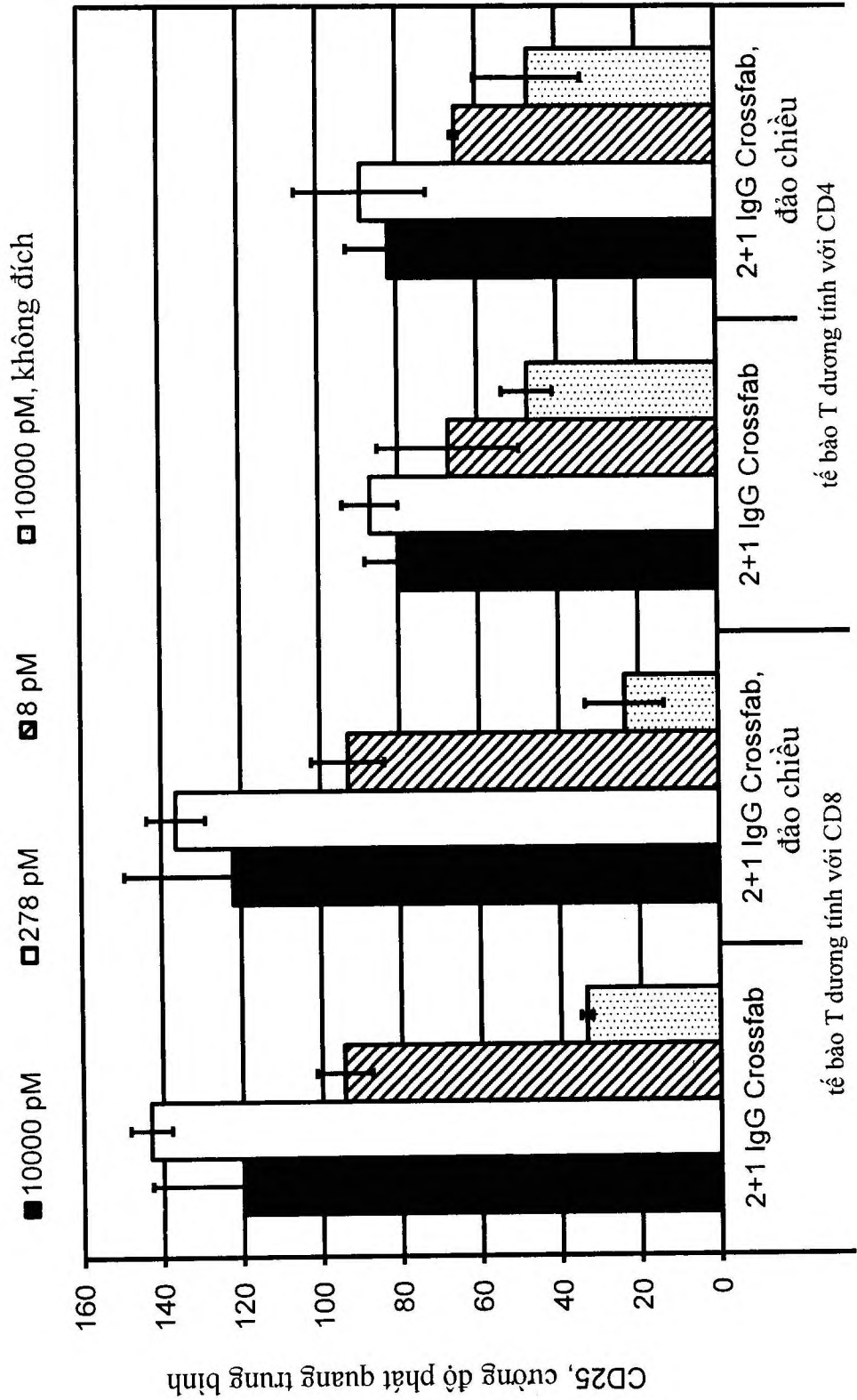


Fig. 60B



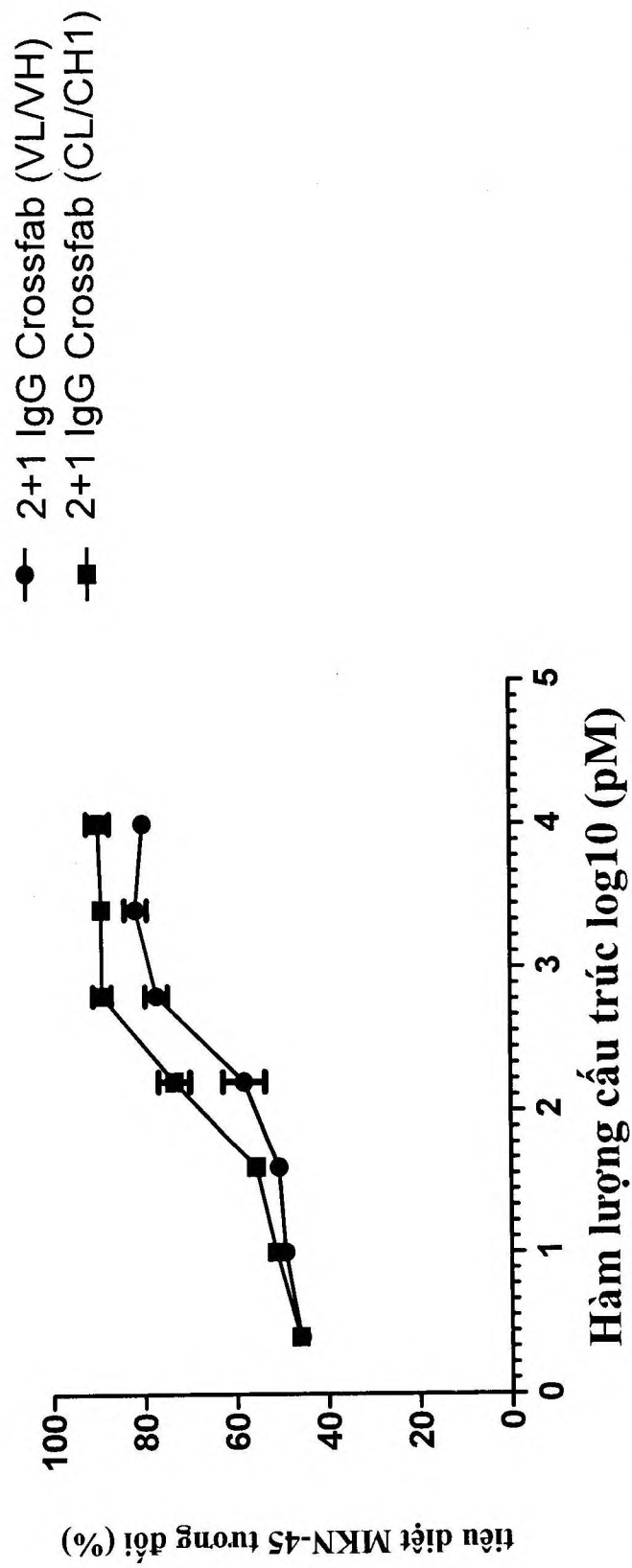


Fig. 61A

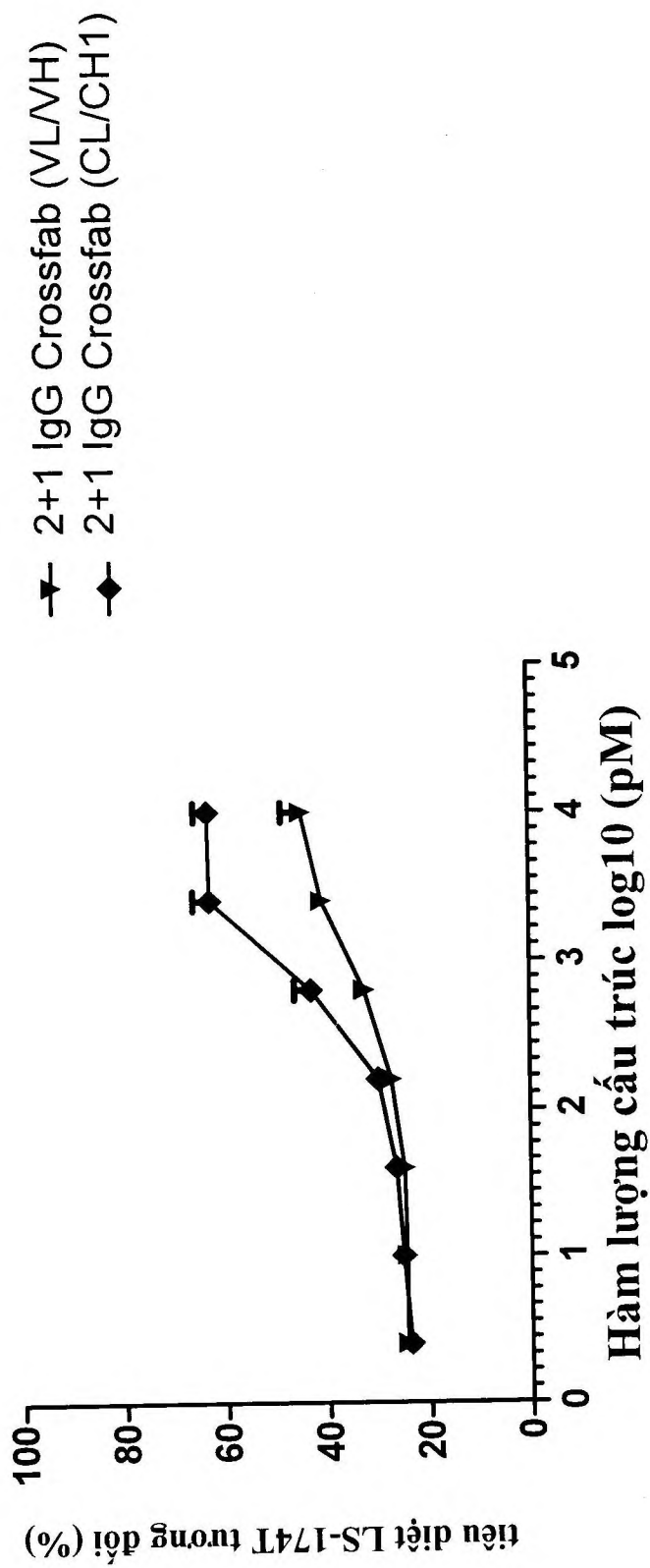


Fig. 61B

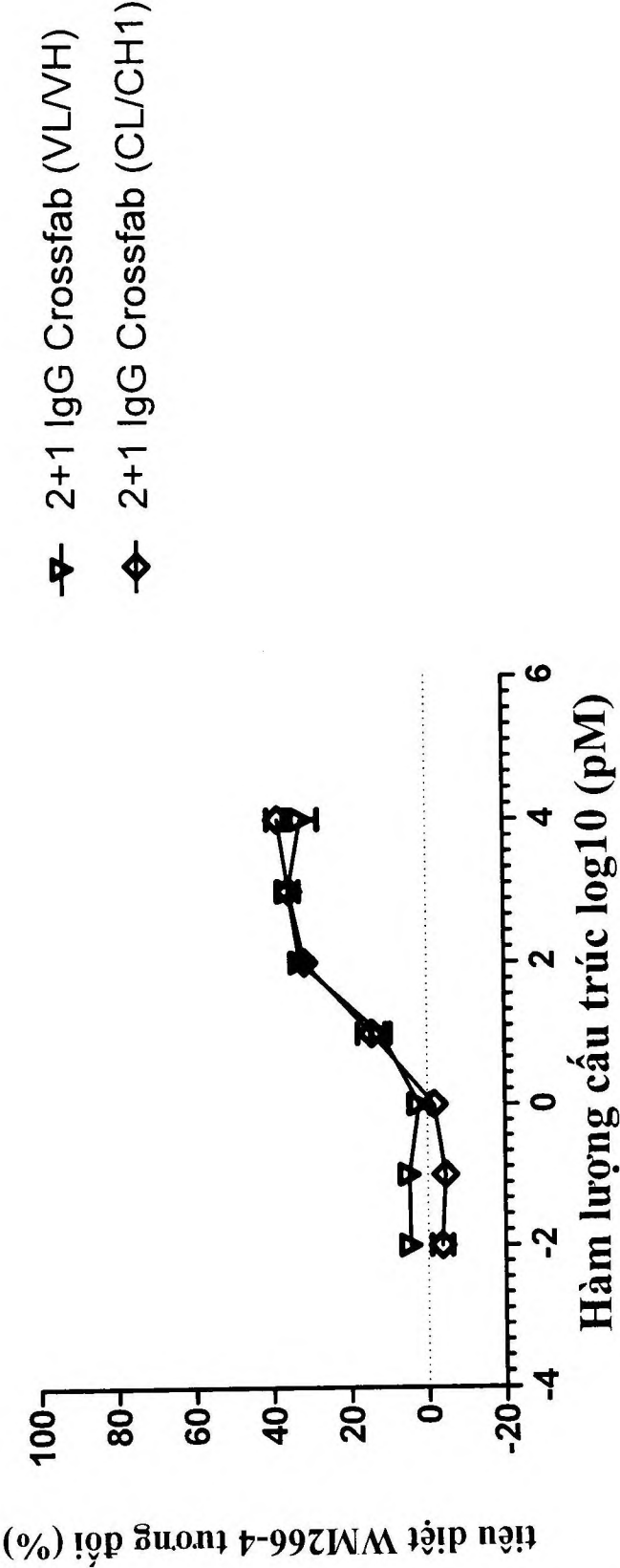


Fig. 62

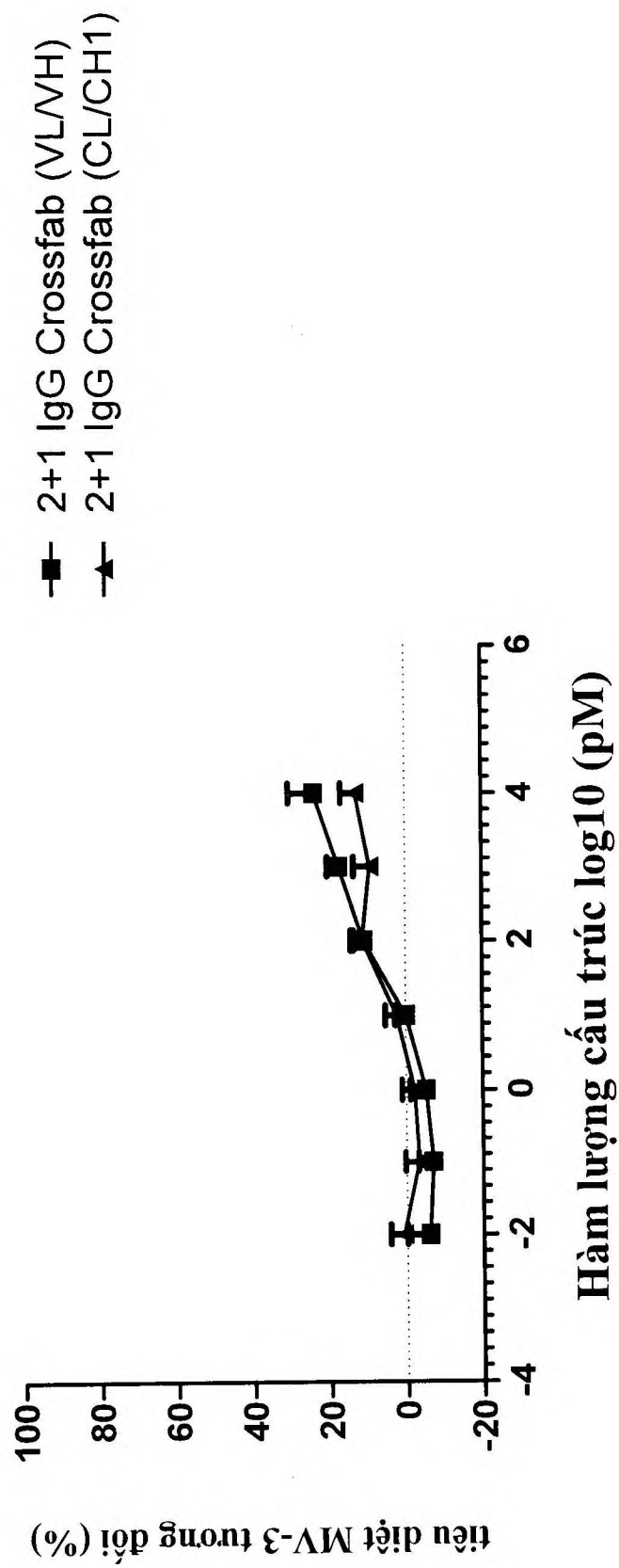


Fig. 63

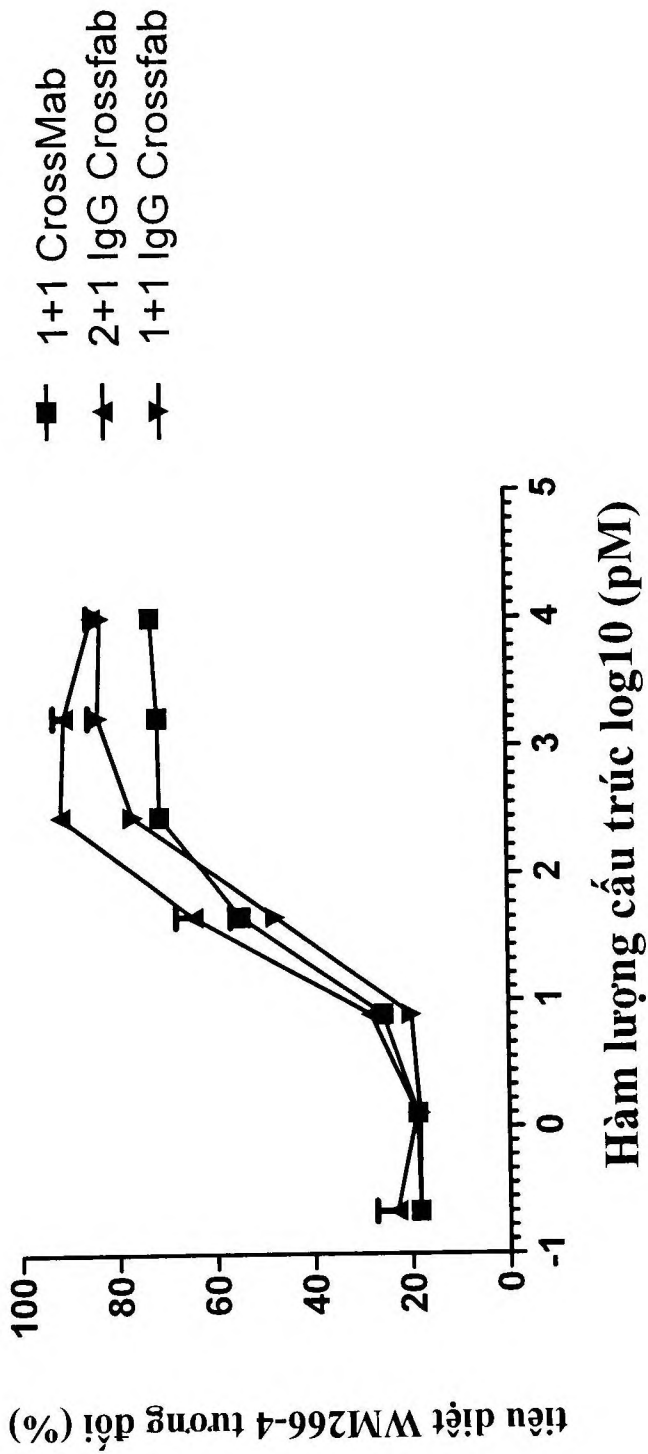


Fig. 64A

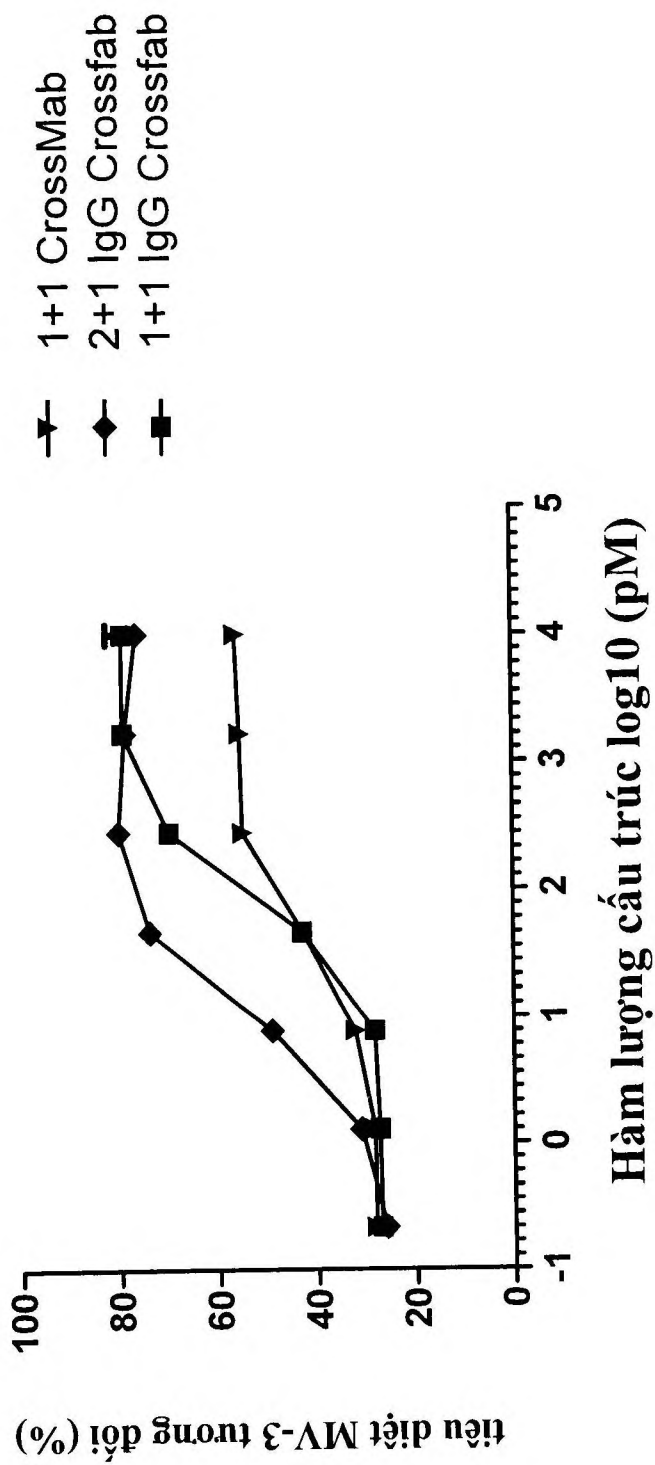


Fig. 64B

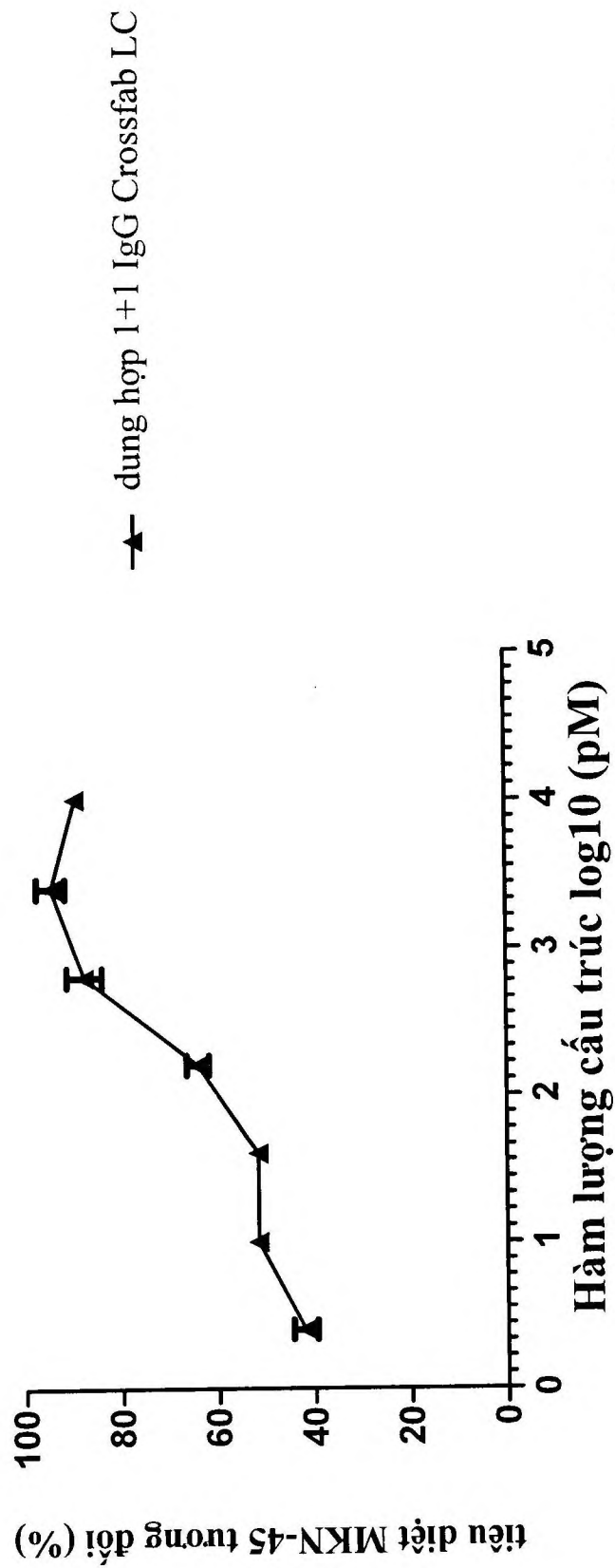


Fig. 65A

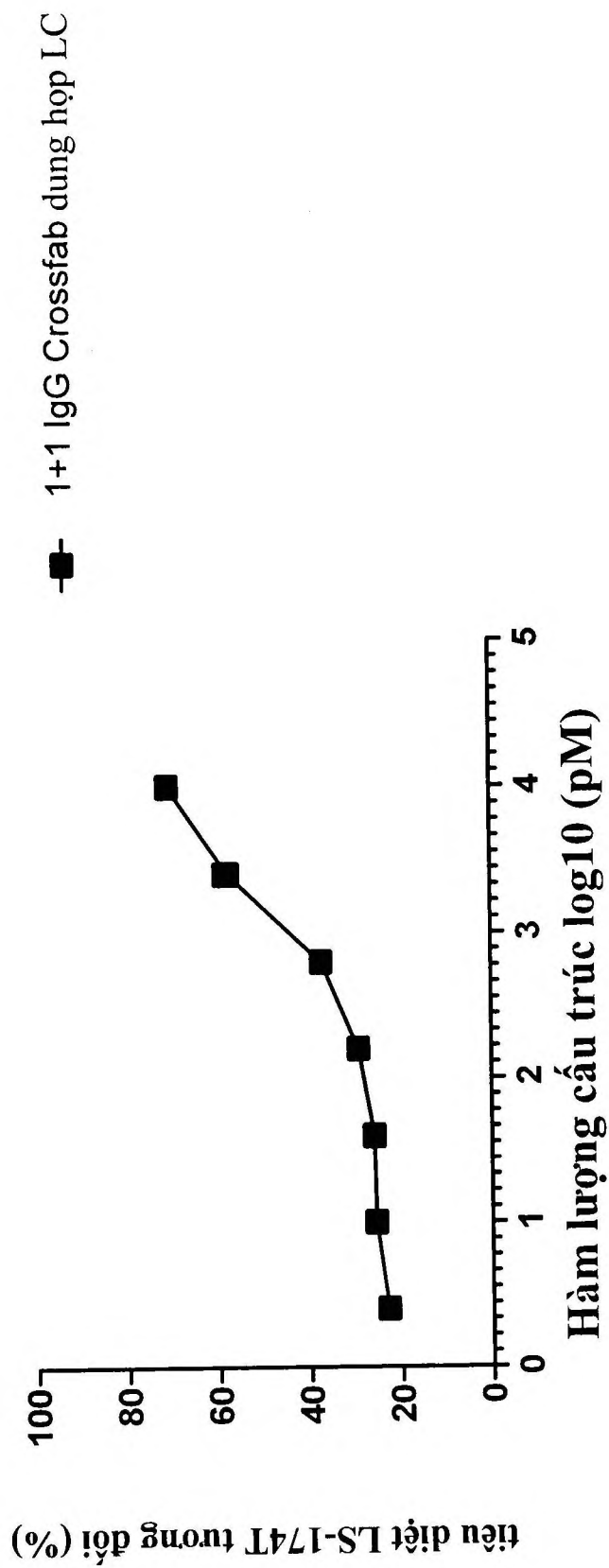
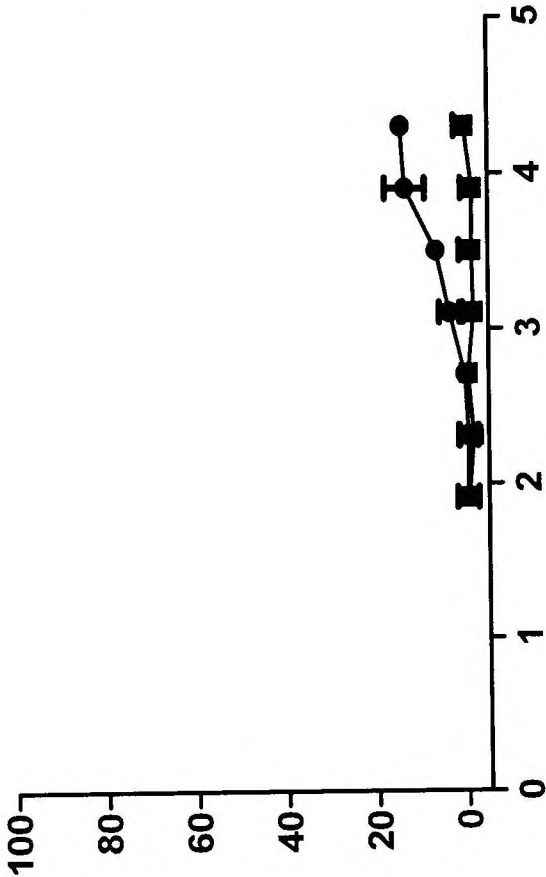


Fig. 65B

tiêu diệt MC38-huCEA tương đối (%)



Hàm lượng cấu trúc log10 (pM)

Fig. 66

- 1+1 IgG Crossfab dung hợp LC
- không nhuộm đích 2+1 IgG Crossfab

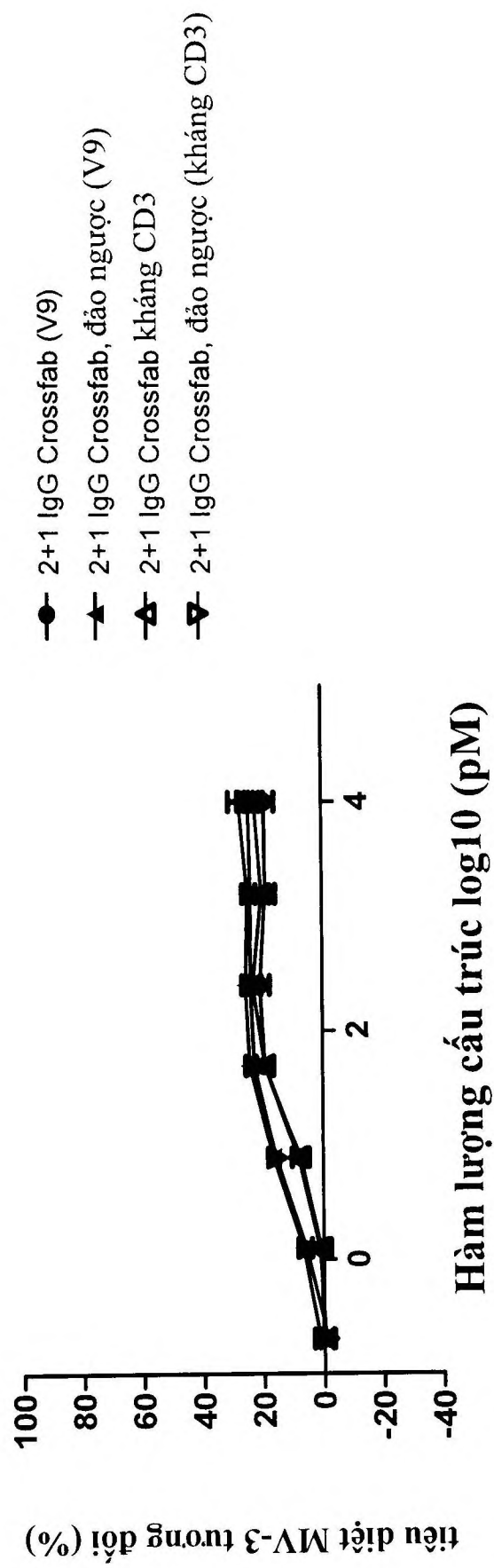


Fig. 67A

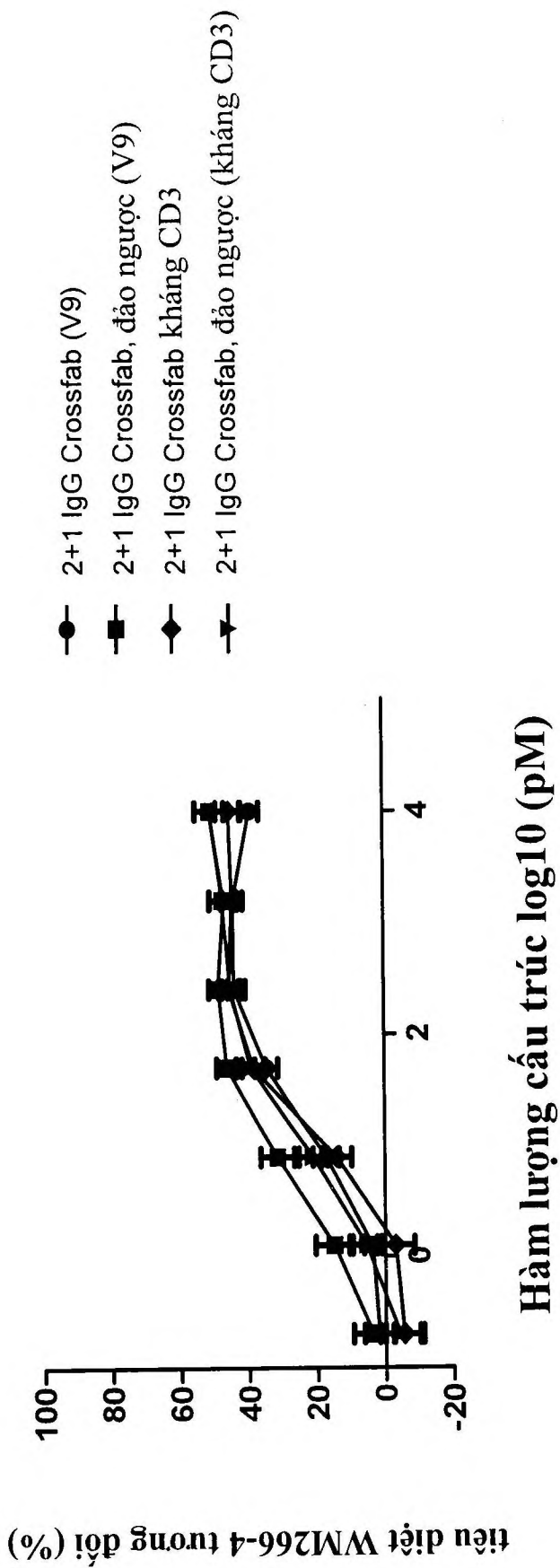


Fig. 67B